

**Załącznik nr 3**

**AUTOREFERAT**

**Kraków, marzec 2023**

**dr Justyna Karkowska-Kuleta**

Zakład Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

ul. Gronostajowa 7

30-387 Kraków

adres e-mail: [justyna.karkowska@uj.edu.pl](mailto:justyna.karkowska@uj.edu.pl)

**1. IMIĘ I NAZWISKO Justyna Karkowska-Kuleta****2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE**

**2013 r.**     **stopień doktora nauk biologicznych w zakresie biochemii** uzyskany w oparciu o rozprawę doktorską zatytułowaną „Adsorpcja i aktywacja składników osocznego układu produkcji kinin na powierzchni grzybów z rodzaju *Candida*” przygotowaną w Zakładzie Biochemii Analitycznej, na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr. hab. Andrzeja Kozika. Uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych w dniu 01.02.2013 podczas publicznej obrony pracy doktorskiej przed Radą Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

**2007 r.**     **tytuł zawodowy magistra biologii** uzyskany po ukończeniu studiów jednolitych magisterskich na Uniwersytecie Jagiellońskim w Krakowie, Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi, kierunek: biologia, specjalizacja: biochemia; Praca magisterska zatytułowana „Wiązanie kininogenu wysokocząsteczkowego i niskocząsteczkowego przez wybrane gatunki rodzaju *Candida*” została wykonana w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rapały-Kozik.

**3. INFORMACJA O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH LUB ARTYSTYCZNYCH.**

<b>01.10.2016 – obecnie</b>	<b>adiunkt</b> (pracownik naukowo-dydaktyczny) w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego;
<b>01.10.2015 – 30.09.2016</b>	<b>asystent</b> (pracownik naukowo-dydaktyczny) w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky na Wydziale

Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego;

01.10.2010 –  
30.09.2015

asystent (pracownik naukowo-dydaktyczny) w Zakładzie Biochemii Analitycznej na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego;

#### 4. OMÓWIENIE OSIĄGNIĘĆ, O KTÓRYCH MOWA W ART. 219 UST. 1 PKT. 2 USTAWY Z DNIA 20 LIPCA 2018 R. PRAWO O SZKOLNICTWIE WYŻSZYM I NAUCE (DZ. U. Z 2021 R. POZ. 478 Z PÓŹN. ZM.).

##### 4.1. TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA

Osiągnięciem stanowiącym podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora habilitowanego, jest cykl publikacji składający się z czterech oryginalnych prac doświadczalnych oraz jednej pracy przeglądowej, ujętych pod wspólnym tytułem:

##### **Występowanie białek wielofunkcyjnych (*moonlighting proteins*) na powierzchni komórek grzybów z rodzaju *Candida*.**

Zróżnicowana powierzchniowa ekspozycja oraz transport zewnątrzkomórkowy nietypowych białek ściany komórkowej patogennych grzybów drożdżopodobnych *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*

Słowa kluczowe: *Candida*, ściana komórkowa, zakażenia grzybicze, enolaza, pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, spektrometria mas, proteom, proteomika

##### 4.2. PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA

Publikacje wchodzące w skład cyklu w kolejności chronologicznej (parametr Impact Factor czasopisma podany dla roku publikacji według bazy danych *Journal Citation Reports Clarivate Analytics*, liczba cytowań podana na dzień 15.02.2023 według bazy danych *Web of Science Clarivate Analytics*):

**A1. Karkowska-Kuleta J.\***, Kozik A. 2014. Moonlighting proteins as virulence factors of pathogenic fungi, parasitic protozoa and multicellular parasites. *Molecular Oral Microbiology* 29, 270–283. <https://doi.org/10.1111/omi.12078>.

\* autor korespondencyjny

IF <sub>2014</sub> : <b>2.784</b>	punktacja MNiSW [2014 A]: <b>35</b> punktacja MEiN [2019]: <b>70</b>	liczba cytowań: <b>53</b>
-----------------------------------	---	---------------------------

Mój udział w przygotowaniu publikacji polegał na:

- uczestnictwie w opracowaniu koncepcji artykułu;

- analizie danych literaturowych i zebraniu bibliografii do artykułu;
- przygotowaniu wszystkich rycin do artykułu oraz całości tekstu manuskryptu, wraz z danymi bibliograficznymi;
- udział w przygotowaniu odpowiedzi dla recenzentów;
- ostatecznym zredagowaniu manuskryptu artykułu po recenzjach, w roli autora korespondencyjnego.

Mój udział szacuję na 80% nakładu pracy niezbędnej do powstania manuskryptu.

**A2. Karkowska-Kuleta J.,** Zajac D., Bochenska O., Kozik A. 2015. Surfaceome of pathogenic yeasts, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*, revealed with the use of cell surface shaving method and shotgun proteomic approach. *Acta Biochimica Polonica* 62(4), 807-819. [https://doi.org/10.18388/abp.2015\\_1040](https://doi.org/10.18388/abp.2015_1040)

IF <sub>2015</sub> : <b>1.187</b>	punktacja MNiSW [2015 A]: <b>15</b> punktacja MEiN [2019]: <b>40</b>	liczba cytowań: <b>21</b>
-----------------------------------	---	---------------------------

Mój udział w przygotowaniu publikacji polegał na:

- opracowaniu koncepcji artykułu;
- udziale w opracowaniu koncepcji badań;
- opracowaniu metodyki badań;
- udziale w planowaniu i organizacji prac eksperymentalnych;
- udziale w przygotowaniu hodowli grzybów drożdżopodobnych oraz próbek poddawanych następnie analizie LC-MS/MS;
- przygotowaniu ryciny 1;
- interpretacji i dyskusji wyników;
- przygotowaniu tekstu manuskryptu, w tym abstraktu, wstępu, wyników i dyskusji;
- udziale w opracowaniu odpowiedzi dla recenzentów;

Mój udział szacuję na 50% nakładu pracy niezbędnej do powstania manuskryptu.

**A3. Karkowska-Kuleta J.\*,** Satala D., Bochenska O., Rapala-Kozik M., Kozik A. 2019. Moonlighting proteins are variably exposed at the cell surfaces of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis* under certain growth conditions. *BMC Microbiology* 19(1):149. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1524-5>.

\* autor korespondencyjny

IF <sub>2019</sub> : <b>2.989</b>	punktacja MEiN [2019]: <b>70</b>	liczba cytowań: <b>24</b>
-----------------------------------	----------------------------------	---------------------------

Mój udział w przygotowaniu publikacji polegał na:

- udziale w opracowaniu koncepcji artykułu;
- opracowaniu koncepcji badań;
- opracowaniu metodyki badań;
- udziale w planowaniu i organizacji prac eksperymentalnych;

- udziale w przygotowaniu hodowli grzybów drożdżopodobnych oraz próbek poddawanych następnie analizie LC-MS/MS;
  - interpretacji i dyskusji wyników;
  - przygotowaniu rycin, napisaniu tekstu manuskryptu, w tym abstraktu, wstępu, opisu stosowanych metod, wyników i dyskusji;
  - udziale w opracowaniu odpowiedzi dla recenzentów, w roli autora korespondencyjnego;
- Mój udział szacuję na 65% nakładu pracy niezbędnej do powstania manuskryptu.

**A4. Karkowska-Kuleta J.\***, Kulig K., Karnas E., Zuba-Surma E., Woznicka O., Pyza E., Kuleta P., Osyczka A., Rapala-Kozik M., Kozik A. 2020. Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. *Cells*. 9(7):E1722. <https://doi.org/10.3390/cells9071722>.

\* autor korespondencyjny

IF <sub>2020</sub> : <b>6.600</b>	punktacja MEiN [2020]: <b>140</b>	liczba cytowań: <b>21</b>
-----------------------------------	-----------------------------------	---------------------------

Mój udział w przygotowaniu publikacji polegał na:

- opracowaniu koncepcji artykułu;
- opracowaniu koncepcji badań;
- udział w opracowaniu metodyki badań;
- planowaniu i organizacji prac eksperymentalnych;
- przygotowaniu próbek do identyfikacji białek pęcherzykowych i wykonaniu wszystkich analiz LC-MS/MS;
- analizie wyników ze spektrometrii mas i udziale w analizie wyników;
- przygotowaniu ryciny 3;
- napisaniu tekstu manuskryptu, w tym abstraktu, wstępu, opisu stosowanych metod, wyników i dyskusji;
- opracowaniu odpowiedzi dla recenzentów, ostatecznym zredagowaniu manuskryptu w roli autora korespondencyjnego;

Mój udział szacuję na 50% nakładu pracy niezbędnej do powstania manuskryptu.

**A5. Karkowska-Kuleta J.**, Wronowska E., Satala D., Zawrotniak M., Bras G., Kozik A., Nobbs A.H., Rapala-Kozik M. 2021. The Als3-mediated attachment of enolase on the surface of *Candida albicans* cells regulates their interactions with host proteins. *Cellular Microbiology*, e13297. <https://doi.org/10.1111/cmi.13297>

IF <sub>2021</sub> : <b>4.115</b>	punktacja MEiN [2021]: <b>140</b>	liczba cytowań: <b>9</b>
-----------------------------------	-----------------------------------	--------------------------

Mój udział w przygotowaniu publikacji polegał na:

- udziale w opracowaniu koncepcji artykułu,
- udziale w opracowaniu koncepcji badań,

- analizie re-adsorpcji enolazy do powierzchni komórek grzybów techniką ELLSA,
  - identyfikacji białek grzybiczych wiążących enolazę z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, chemicznego sieciowania i spektrometrii mas,
  - wskazaniu białek wiążących enolazę z wykorzystaniem modelu komórek *Saccharomyces cerevisiae* z nadprodukcją adhezyn *Candida albicans*,
  - udziale w weryfikowaniu wyników,
  - przygotowaniu tabeli 1 oraz tabeli S2 uzupełniającej do manuskryptu,
  - przygotowaniu rycin 4a, 5, 7a,
  - napisaniu części tekstu manuskryptu, w tym abstraktu, opisu stosowanych metod, części opisu wyników, części dyskusji,
  - korekcie tekstu manuskryptu,
  - redagowaniu odpowiedzi dla recenzentów.
- Mój udział szacuję na 55% nakładu pracy niezbędnej do powstania manuskryptu.

**Tabela 1.** Sumaryczne zestawienie danych naukometrycznych dotyczących wskazanego cyklu składającego się z 5 publikacji.

Sumaryczny IF	Sumaryczna punktacja MNiSW/ MEiN	Sumaryczna liczba cytowań
<b>17.675</b>	punktacja 2014-2015* <b>50</b>	<b>128</b>
	punktacja 2018-2021** <b>350</b>	

\* punkty za lata 2014-2015 przypisano na podstawie ujednoczonych wykazów czasopism naukowych opublikowanych przez BIP MNiSW przed 18 grudnia 2019 (lista Część A)

\*\* punkty za lata 2019-2021 przypisano na podstawie ujednoczonego wykazu czasopism naukowych opublikowanego przez BIP MNiSW z dnia 18 grudnia 2019 oraz BIP MEiN z dnia 1 grudnia 2021

### 4.3. OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO I UZYSKANYCH WYNIKÓW UJĘTYCH W PRACACH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

#### 4.3.1. Omówienie zagadnienia

Ściana komórkowa mikroorganizmów to dynamiczna struktura odpowiedzialna za utrzymanie kształtu i integralności komórki. Bierze ona udział w procesach wzrostu, rozmnażania i podziału komórek, jest zaangażowana w ochronę przed czynnikami stresu środowiskowego, w dwukierunkowy, selektywny transport różnorodnych cząsteczek oraz w interakcje z innymi drobnoustrojami zasiedlającymi daną niszę ekologiczną. Ponadto, ściana komórkowa mikroorganizmów chorobotwórczych dla człowieka stanowi tę część komórki patogenu, która jest odpowiedzialna za stały i bezpośredni kontakt z gospodarzem podczas zainicjowania i dalszego rozwoju infekcji (Latgé, 2010). W przypadku komórek patogenów grzybiczych, ściana komórkowa jest zbudowana głównie z polisacharydów, białek oraz niewielkiej ilości lipidów i barwników (Free, 2013). Polisacharydy, takie jak chityna, chitozan,  $\beta$ -1,3-glukan,  $\beta$ -1,6-glukan,  $\beta$ -1,3-/ $\beta$ -1,4-glukan czy  $\alpha$ -1,3-glukan, tworzą rozbudowane, trójwymiarowe rusztowanie i strukturalny zrąb ściany komórkowej grzybów, do którego przyłączone mogą być wiązaniami kowalencyjnymi lub niekowalencyjnymi inne składniki

ściany, w tym różnorodne białka, które często są glikozylowane i zaopatrzone w rozgałęzione łańcuchy mannanu, galaktomannanu lub ksylomannanu (Latgé, 2007; Free, 2013). Wśród owych białek można wyróżnić enzymy bezpośrednio zaangażowane w biogenezę ściany komórkowej, w tym rozliczne hydrolazy glikozydowe, odpowiedzialne za przebudowę elementów strukturalnych ściany i za jej dynamikę w dostosowywaniu się komórki do zmiennych warunków środowiskowych. Ponadto, dużą grupę białek ściany komórkowej stanowią białka o właściwościach adhezyjnych, odpowiedzialne za przyleganie komórek patogenów do tkanek gospodarza, a także do tworzyw sztucznych lub metali, w tym do powierzchni cewników, implantów, stentów czy protez (Jung i in., 2020). Jest to związane z możliwością tworzenia przez drobnoustroje wielokomórkowych, skomplikowanych struktur biologicznych, jakimi są biofilmy, co skutkuje zwiększoną wytrzymałością patogenów na mechaniczne usuwanie z miejsca infekcji, ich nasiloną zjadliwością oraz opornością na standardowo stosowane leki przeciwgrzybicze (Polke i in., 2015). Powierzchniowe grzybicze białka adhezyjne są także zaangażowane w oddziaływania z komórkami układu odpornościowego gospodarza, a także w wiązanie szeregu białek biorących udział w rozwoju zarówno nieswoistej, jak i swoistej odpowiedzi odpornościowej, jak również białek odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy i hemostazy w organizmie gospodarza. Zdolność wiązania białek układu dopełniacza, przeciwciał, inhibitorów proteaz, peptydów przeciwdrobnoustrojowych, białek składających się na kluczowe proteolityczne kaskady osoczowe jak układ krzepnięcia, układ produkcji kinin czy fibrynolizy, daje patogennym mikroorganizmom możliwość bezpośredniego wpływu na działanie tych systemów, unikania i modulowania reakcji układu odpornościowego gospodarza, a także zdecydowanie ułatwia rozprzestrzenianie się drobnoustrojów w organizmie i dalszy rozwój infekcji, także związanej z przechodzeniem choroby wywołanej przez grzyby w stan przewlekły (Luo i in., 2013). Istotna w tych procesach jest także rola grzybiczych wydzielniczych proteinaz, które hydrolizują substraty obecne zarówno w otoczeniu komórek grzybów, jak też związane na ich powierzchni, prowadząc do ich aktywacji lub dezaktywacji (Naglik i in., 2003; Bras i in., 2013; Bochenska i in., 2015).

Liczne czynniki wirulencji i mechanizmy przyczyniające się do zjadliwości zostały zidentyfikowane dla grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* (rząd *Saccharomycetales*, klasa *Saccharomycetes*, gromada *Ascomycota*, podkrólestwo *Dikarya*), które aktualnie stanowią najbardziej rozpowszechnione grzybicze patogeny człowieka (Arendrup, 2013). Drożdżaki z rodzaju *Candida* są przyczyną zarówno stosunkowo niegroźnych, ale uciążliwych i bolesnych infekcji powierzchniowych skóry i błon śluzowych, jak również poważnych zakażeń narządów wewnętrznych i rozprzestrzenionych infekcji związanych z obecnością mikroorganizmów w krwioobiegu, skutkujących w niektórych przypadkach rozwojem sepsy lub wstrząsu septycznego u zakażonych pacjentów (Patricio i in., 2019; Bassetti i in., 2020, Pfaller i in., 2020). *C. albicans* jest szeroko rozpowszechnionym gatunkiem z rodzaju *Candida*, który obecnie jest identyfikowany jako najczęstsza przyczyna kandydoz u ludzi, jednakże w ciągu ostatnich kilku dekad zaobserwowano wzrost częstości zakażeń gatunkami *Candida non-albicans*, w tym *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*), *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. auris*, *C. dubliniensis* oraz innymi gatunkami z tego rodzaju, co stanowi znaczący problem epidemiologiczny i terapeutyczny z racji zróżnicowanej zjadliwości tych gatunków

i pojawiającej się wśród nich niebezpiecznej oporności na stosowane dostępne leki przeciwgrzybicze (Pfaller i in., 2019).

Przyjmuje się, że na groźne, ustrojowe zakażenia wywołane przez *Candida* najbardziej narażone są osoby z osłabionym układem odpornościowym, bądź to na skutek wrodzonych niedoborów oporności, cukrzycy, zarażenia wirusem HIV, lub jako konsekwencja przebytych zabiegów chirurgicznych, urazów, chorób nowotworowych, chemioterapii; także pacjenci przebywający długotrwale na oddziałach intensywnej opieki medycznej, poddawani leczeniu glikokortykoidami lub długotrwałej antybiotykoterapii, żywieni pozajelitowo, czy też noworodki o niskiej masie urodzeniowej (Logan i in., 2020; McCarty i in., 2021). Niemniej jednak należy zaznaczyć, że powierzchniowe kandydozy zajmujące jamę ustną, błony śluzowe układu pokarmowego czy układu rozrodczego, które co prawda nie stanowią znaczącego zagrożenia dla życia zainfekowanego pacjenta, ale są niezwykle kłopotliwe, nawracające i trudne do całkowitego wyleczenia, mogą rozwinąć się już w efekcie nieznacznych zaburzeń w działaniu układu odpornościowego czy też w przypadku zaburzenia równowagi hormonalnej albo składu fizjologicznej mikroflory (Lewis i Williams, 2017; Sustr i in., 2020).

W związku z realnym zagrożeniem, jakie grzyby z rodzaju *Candida* stanowią dla dużej części populacji, które jest również skutkiem braku szybkich, wiarygodnych i łatwo dostępnych metod diagnostyki kandydoz, jak również dosyć ograniczonym repertuarem dostępnych leków przeciwgrzybiczych oraz coraz częściej wykształcaną przez grzyby opornością na owe leki, konieczne jest dokładne poznanie mechanizmów wirulencji tych patogenów w celu wskazywania nowych celów terapeutycznych oraz projektowania skutecznych środków prewencji, użytecznych w celu zapobiegania zakażeniom grzybiczym u podatnych na nie osób. Oprócz produkcji wspomnianych wyżej grzybiczych powierzchniowych białek adhezyjnych i wydzielniczych proteinaz oraz zdolności do tworzenia biofilmu, istotną cechą przyczyniającą się do wirulencji gatunków z rodzaju *Candida*, jest zdolność do występowania w co najmniej dwóch różnych formach morfologicznych, czyli w formie pojedynczych, owalnych komórek drożdżopodobnych, jak również w postaci strzępek, przy czym zdolność do wytwarzania struktur filamentarnych i ich szczegółowa budowa może być różna dla poszczególnych gatunków, na przykład gatunek *C. glabrata* nie wytwarza w ogóle strzępek (Brunke i Hube, 2013). Forma strzępkowa jest uznawana za postać bardziej adherentną oraz inwazyjną, a przez to niezbędną do rozwinięcia pełnej wirulencji przez *C. albicans*, niemniej jednak obie formy morfologiczne grzybów są wymagane do rozpoczęcia i dalszego rozwoju infekcji (Thompson i in., 2011). Zmiana formy morfologicznej jest regulowana przez szereg czynników transkrypcyjnych zależnie od kilku, co prawda różnych, lecz również komplementarnych, wewnątrzkomórkowych szlaków sygnalizacyjnych i odbywa się ona w odpowiedzi na różnorodne czynniki zewnątrzkomórkowe, takie jak pH powyżej 7, temperatura 37°C, obecność N-acetyloglukozaminy, niedobór azotu, hipoksja, podwyższone stężenie dwutlenku węgla oraz obecność osocza (Chen i in., 2020). Co istotne, proces strzępkowania następujący w odpowiedzi na zmianę warunków środowiskowych jest ściśle związany z przebudową ściany komórkowej i eksponowaniem na powierzchni komórek odmiennego zestawu białek powierzchniowych w porównaniu do komórek drożdżopodobnych, co jest w pewnym stopniu związane także z większą adhezyjnością i inwazyjnością strzępek (Fan i in., 2013; Gil-Bona i in., 2015; Desai, 2020).



Główne strukturalne polisacharydy ściany komórkowej grzybów z rodzaju *Candida* to chityna (polimer cząsteczek  $\beta$ -glukozaminy połączonych wiązaniami  $\beta$ -1,4-glikozydowymi), zlokalizowana w ścianie komórkowej jako warstwa położona najbliższej błony komórkowej, oraz rozgałęziony  $\beta$ -1,3-glukan z kowalencyjnie przyłączonymi cząsteczkami  $\beta$ -1,6-glukanu, przy czym funkcję stabilizującą rusztowanie ściany komórkowej pełnią także liczne wiązania wodorowe występujące pomiędzy cząsteczkami polisacharydów. Istotną częścią ściany komórkowej *Candida* są białka powierzchniowe, wśród których przede wszystkim wyodrębnia się grupę typowych białek ściany komórkowej, które są zaopatrzone w peptyd sygnałowy, a ich wydzielanie na zewnątrz komórki przebiega na drodze klasycznego mechanizmu sekrecji z udziałem siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego, gdzie podlegają również glikozylacji reszt aminokwasowych seryny i treoniny (O-glikozylacja) lub asparaginy (N-glikozylacja), a następnie są umieszczane na powierzchni komórki poprzez kowalencyjne wiązania do cząsteczek polisacharydów lub innych białek ściany komórkowej, bądź także poprzez zakotwiczenie w błonie komórkowej poprzez cząsteczkę glikozylofosfatydyloinozytolu (GPI) (Kapteyn i in., 2000; Chaffin, 2008). Wyróżnia się również grupę białek powierzchniowych, które nie są związane kowalencyjnie do pozostałych elementów ściany komórkowej, ale są transportowane do tej lokalizacji również na drodze klasycznej ścieżki sekrecji i lokowane w ścianie komórkowej, gdzie pełnią ważne funkcje strukturalne lub enzymatyczne związane z przebudową pozostałych elementów ściany komórkowej (Chaffin, 2008). Typowe białka ściany komórkowej, związane zarówno poprzez wiązania kowalencyjne jak i niekowalencyjne, oprócz ważnej roli w organizacji i modelowaniu ściany, pełnią również istotne funkcje w adhezji grzybów drożdżopodobnych. Jedną z licznie reprezentowanych grup adhezyn powierzchniowych grzybów z rodzaju *Candida* jest rodzina białek podobnych do aglutynin (Als, ang. *agglutinin-like sequence protein family*), które należą do typowych białek ściany komórkowej, ponieważ są zaopatrzone w peptyd sygnałowy, usuwany podczas procesowania białka, oraz są transportowane na zewnątrz komórki na drodze klasycznego mechanizmu sekrecji. Ponadto, na C-końcu cząsteczki białka z rodziny Als posiadają sekwencję konsensusową dla przyłączenia kotwicy GPI, dzięki której mogą być najpierw ulokowane na powierzchni komórki, a następnie kowalencyjnie związane do  $\beta$ -1,6-glukanu w ścianie komórkowej (Lu i in., 1995). Co więcej, białka reprezentujące tę rodzinę zidentyfikowano nie tylko dla gatunku *C. albicans*, ale również dla innych gatunków *Candida*, w tym *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis* (Oh i in., 2019; 2021a, 2021b). Ponadto wykazano, że białka Als cechują się dość dużym strukturalnym podobieństwem, nie tylko w obrębie rodziny identyfikowanej dla danego gatunku, ale również pomiędzy różnymi gatunkami *Candida* (Oh i in., 2021a). Jak dotąd, najlepiej scharakteryzowanym reprezentantem rodziny Als jest białko Als3 produkowane przez *C. albicans*, składające się z czterech głównych domen: domeny N-końcowej (obejmującej w przybliżeniu fragment łańcucha białkowego składający się włącznie z sekwencją sygnałową z reszt aminokwasowych 1-329), domeny T (obejmującej fragment 330-433) bogatej w reszty treoniny oraz zawierającej region odpowiedzialny za tworzenie amyloidu (AFR, ang. *amyloid forming region*), następnie centralnej domeny TR z powtórzeniami tandemowymi oraz domeny C-końcowej z miejscem wiązania dla kotwicy GPI (Hoyer i Cota, 2016). W obrębie domeny N-końcowej zlokalizowana jest kieszeń wiążąca ligandy, uformowana dzięki utworzeniu czterech mostków dwusiarczkowych, ze zlokalizowaną w niej naładowaną dodatnio resztą lizyny, która oddziałuje z C-końcową grupą

karboksylową białek i peptydów wiązanych przez adhezyne, a wzajemne oddziaływania dodatkowo są ułatwiane i wzmacniane przez obecność fragmentu AFR (Lipke i in., 2017; Oh i Hoyer, 2022). Als3 jest białkiem charakterystycznym przede wszystkim dla formy strzępkowej *C. albicans* i zaangażowanym w szereg różnych typów oddziaływań z cząsteczkami gospodarza, począwszy od wiązania białek osocznego układu produkcji kinin, ferrytyny, białek macierzy zewnątrzkomórkowej, po oddziaływania z kadherynami obecnymi na powierzchni komórek śródbłonna i nabłonka (Phan i in., 2007; Almeida i in., 2008; Nobbs i in., 2010), co sprawia, że można je określić mianem wielofunkcyjnej adhezyny i inwazy, a tym samym jest bardzo ważnym czynnikiem wirulencji *C. albicans*.

Dotychczas w większości badań mających na celu identyfikację białek ściany komórkowej grzybów z rodzaju *Candida* wskazywano przede wszystkim liczne białka, które zdawały się być „uprawnione” do tej lokalizacji, czyli te, które były zaopatrzone w peptyd sygnałowy, kierujący je na klasyczną ścieżkę sekrecji. Pozostałe białka, tzw. nietypowe białka ściany komórkowej, często pomijano w analizach traktując je jako efekt zanieczyszczenia podczas przygotowania ściany komórkowej do badań (Chaffin, 2008). Jednak powtarzające się doniesienia literaturowe wskazujące na ich częstą obecność na powierzchni komórek, potwierdzaną wieloma odmiennymi metodami, przyczyniły się do poświęcenia większej uwagi tej grupie molekuł. Identyfikacja poszczególnych nietypowych białek ściany komórkowej wykazała, że są to często białka enzymatyczne pochodzenia cytozolowego lub wywodzące się z wewnątrzkomórkowych organelli, często zaangażowane w podstawowe cykle i szlaki biochemiczne we wnętrzu komórki, pozbawione peptydu sygnałowego niezbędnego do sekrecji z wykorzystaniem klasycznego mechanizmu wydzielania. Jednocześnie wykazywano, że niektóre z tych białek mogą pełnić istotne funkcje na powierzchni komórek grzybów, związane z odpowiedzią mikroorganizmów na stres oksydacyjny czy z oddziaływaniem z różnorodnymi ligandami gospodarza (Jong i in., 2003; Urban i in., 2005; Ruiz-Herrera i in., 2006), a zatem można je zaliczyć do specyficznego rodzaju białek wielofunkcyjnych, określanych jako *moonlighting proteins*. Ta niezwykle ciekawa grupa białek została wyodrębniona i zdefiniowana w 1999 roku, kiedy to precyzyjnie określono kryteria, na podstawie których można wliczyć białko do grupy *moonlighting* (Jeffery, 1999). Są to zatem białka, które oprócz swojej podstawowej, często ewolucyjnie konserwatywnej funkcji, mogą pełnić też odmienną funkcję w zależności od (i) lokalizacji w komórce lub (ii) typu komórki, w której dane białko jest produkowane, (iii) od stanu oligomeryzacji, (iv) utworzenia kompleksu z innymi białkami, czy (v) związania substratu, produktu lub kofaktora. Natomiast do tej grupy nie wlicza się cząsteczek, które są produktem fuzji genów czy alternatywnego składania genów, jak również białek, których odmiennie funkcje są zależne od modyfikacji translacyjnych, białek pełniących tę samą funkcję w różnych lokalizacjach komórkowych lub w różnych typach komórek (Jeffery, 1999). Przyjmuje się, że nabycie nowej, zupełnie odmiennej funkcji białka na drodze ewolucji nie powinno zaburzać jego podstawowej funkcji, ale może stanowić korzyść energetyczną dla komórki oraz zapewniać lepsze dostosowywanie się organizmu do warunków środowiskowych (Jeffery, 2003).

Pierwszym jednoznacznie opisanym przykładem *moonlighting protein* była enolaza (EC 4.2.1.11), enzym z klasy liaz, który w cytolozu przeprowadza przedostatnią reakcję glikolizy, katalizując dehydratację 2-fosfoglicerynianu do fosfoenolopirogronianu. Enolaza została zidentyfikowana również jako tau-krystalina, strukturalne białko soczewki oka

minogów, niektórych ryb, gadów i ptaków (Wistow i in., 1988) oraz białko szoku cieplnego drożdży (Iida i Yahara, 1985). W następnych latach wielokrotnie identyfikowano w komórkach organizmów wywodzących się ze wszystkich królestw kolejne białka zaliczające się do grupy *moonlighting proteins*.

W trakcie badań mechanizmów wirulencji *C. albicans*, prowadzonych podczas realizacji mojej pracy doktorskiej i dotyczących oddziaływania białek zlokalizowanych na powierzchni komórek patogenu z ludzkim białkiem należącym do osoczowego układu produkcji kinin – kininogenem wielkocząsteczkowym (HK), korzystając z chromatografii powinowactwa i spektrometrii mas zidentyfikowałam kilka nietypowych białek ściany komórkowej patogenu, które wiązały badane sześci domenowe białko ludzkie, będące prekursorem ważnych prozapalnych i wazoaktywnych peptydów – kinin. Były to, między innymi, trzy enzymy glikolityczne – enolaza (Eno1), mutaza fosfoglicerynianowa (Pgm1) i izomeraza triozofosforanowa (Tpi1), które wraz z typowym białkiem ściany komórkowej, adhezyną Als3, odpowiadały za oddziaływanie z fragmentem cząsteczki HK obejmującym aminokwasy 333-352 w domenie 3, z C-końcowym fragmentem domeny 5 oraz N-końcowym i C-końcowym fragmentem domeny 6 HK (II.3.5). Uzyskane wyniki, wskazujące na powierzchniową lokalizację i istotną rolę nietypowych białek ściany komórkowej *C. albicans* w patogenezie infekcji wywoływanych przez te grzyby, stanowiły ważną przesłankę do prowadzenia dalszych badań dotyczących obecności *moonlighting proteins* na ścianie komórkowej *Candida*. Kluczową kwestią pozostawało wskazanie odpowiedzi na dalsze pytania: (i) czy białka *moonlighting proteins* są również obecne na powierzchni komórek innych gatunków patogennych grzybów z rodzaju *Candida*, (ii) czy ich powierzchniowa obecność jest zależna od warunków hodowli lub formy morfologicznej, (iii) czy są one zaangażowane w interakcje z gospodarzem i na czym mogą polegać ewentualne oddziaływania, oraz (iv) jaki jest mechanizm transportu i deponowania na powierzchni komórki białek, które nie posiadają peptydu sygnałowego kierującego na klasyczną ścieżkę wydzielania, a ich kanoniczna funkcja jest przypisana do lokalizacji cytoplazmatycznej.

#### 4.3.2. Cel badawczy i omówienie wyników

Uwzględniając istotne obserwacje dotyczące obecności *moonlighting proteins* na powierzchni komórek *C. albicans* wyznaczyłam następujące cele mojej dalszej pracy badawczej, obejmujące dwa główne, uzupełniające się obszary badawcze:

1. badanie zróżnicowania powierzchniowej ekspozycji nietypowych białek ściany komórkowej – *moonlighting proteins* – na komórkach grzybów drożdżopodobnych z gatunków *Candida non-albicans*, będących ważnymi i obecnie coraz bardziej rozpowszechnionymi patogenami człowieka, tj. *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*,
2. identyfikacja mechanizmów transportu białek cytoplazmatycznych na powierzchnię komórek oraz ich lokowania w obrębie ściany komórkowej grzybów.

W obrębie tych obszarów wskazałam następujące szczegółowe cele badawcze:

- 1.1. podsumowanie dostępnych danych literaturowych i dowodów dotyczących obecności na powierzchni komórek i udziału *moonlighting proteins* w patogenezie infekcji

wywoływanych przez różne eukariotyczne organizmy chorobotwórcze, ze szczególnym uwzględnieniem grzybów drożdżopodobnych (A1)

- 1.2. identyfikacja zestawu białek obecnych na powierzchni komórek *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis* występujących w dwóch formach morfologicznych – jako pojedyncze komórki oraz formy filamentarne: strzępki i pseudostrzępki, ze wskazaniem białek *moonlighting* oraz ilościowe oszacowanie częstości występowania poszczególnych białek z zastosowaniem techniki polegającej na hydrolizie białek powierzchniowych trypsyną (ang. *cell surface shaving with trypsin*) z zachowaniem integralności komórek (A2).
- 1.3. scharakteryzowanie zestawu białek obecnych na powierzchni komórek *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* hodowanych w warunkach naśladujących różne nisze w organizmie gospodarza, które mogą być zasiedlane przez grzyby drożdżopodobne podczas infekcji (A3)
- 2.1. izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych produkowanych i wydzielanych przez komórki grzybów gatunków *C. glabrata*, *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* oraz identyfikacja białek przenoszonych przez te struktury na zewnątrz komórki (A4)
- 2.2. analiza mechanizmu deponowania enolazy *C. albicans* na powierzchni komórek tego gatunku występujących w formie pojedynczych komórek oraz strzępek, wraz ze wskazaniem cząsteczek odpowiedzialnych za powierzchniowe ułożenie badanego białka *moonlighting* (A5).

### Ad.1.1

W okresie przygotowania mojej pracy doktorskiej, kiedy to wskazałam na potencjalny udział grzybiczych *moonlighting proteins* obecnych na powierzchni komórek *C. albicans* w oddziaływaniach z ludzkim osoczowym białkiem HK, kwestia powierzchniowej lokalizacji nietypowych białek ściany komórkowej grzybów drożdżopodobnych była nadal zagadnieniem kontrowersyjnym. Brak zidentyfikowanego peptydu sygnałowego w obrębie sekwencji tych białek i nieznamość mechanizmów ich sekrecji wpływały na to, że najczęściej powierzchniowa lokalizacja wewnątrzkomórkowych białek grzybów była uznawana za efekt zanieczyszczenia zawartością cytoplazmatyczną podczas przygotowania ściany komórkowej do badań, związanego z dezintegracją komórek mikroorganizmów w trakcie procedury, czy też za zjawisko przypadkowe i losowe, będące konsekwencją śmierci innych komórek grzybów znajdujących się w otoczeniu i niespecyficzej adsorpcji pozostałości komórkowych do ściany komórkowej żywych komórek. Takie przypuszczenia prezentowane w literaturze implikowały przeświadczenie o znikomej i nieistotnej roli tych białek na powierzchni komórki (de Groot i in., 2004; Klis i in., 2011). Wobec tego, w pierwszym etapie podjętych przeze mnie badań podsumowałam dostępne doniesienia literaturowe, dotyczące identyfikacji białek *moonlighting* na powierzchni komórek różnych patogenów eukariotycznych, w tym grzybów chorobotwórczych, pasożytniczych pierwotniaków oraz pasożytów wielokomórkowych, ze szczególnym uwzględnieniem grzybów drożdżopodobnych *C. albicans*, które zawarłam w publikacji przeglądowej A1. W tej pracy przedstawiłam aktualny stan badań i hipotez dotyczących *moonlighting proteins* i ich roli w patogenezie infekcji. Na ówczesnym etapie badań nadal niewiele wiadomo było o potencjalnych mechanizmach sekrecji białek cytoplazmatycznych pozbawionych klasycznego peptydu sygnałowego. Ponadto zwracano

uwagę na konieczność rozgraniczenia między białkami, które są celowo transportowane na powierzchnię komórki na drodze nieklasycznej sekrecji, a tymi, które uległy readsorpcji do powierzchni, znajdując się uprzednio w najbliższym otoczeniu komórki i mogły pochodzić z innych, zniszczonych komórek.

Jednym z konkretnych przykładów białka *C. albicans*, dla którego podjęto dokładne badania funkcji w zależności od pochodzenia oraz lokalizacji komórkowej, było białko Tsa1 (ang. *thiol-specific antioxidant-like protein 1*), które zidentyfikowano na powierzchni jedynie w przypadku komórek występujących w formie strzępkowej, natomiast w pojedynczych, drożdżopodobnych komórkach *C. albicans* białko Tsa1 występowało tylko w jądrze komórkowym i cytozolu (Urban i in., 2003). Wykazano także, że białko Tsa1 nie adsorbuje do ściany komórkowej z roztworu, z którym kontaktuje się ściana komórkowa, a translokacja Tsa1 do ściany komórkowej strzępek jest zależna od regulacji przez czynnik transkrypcyjny Efg1, co sugeruje udział szlaku cAMP/kinaza białkowa A w pojawianiu tego białka na powierzchni *C. albicans*, gdzie pełni ono istotną rolę w odporności na stres oksydacyjny oraz w przebudowie ściany komórkowej (Urban i in., 2005).

Zasadniczo, na podstawie analizy wyników badań białek ściany komórkowej *C. albicans* prowadzonych z wykorzystaniem różnych technik proteomicznych (Hernández i in., 2010; Vialás i in., 2012) wyszczególniłam trzy główne grupy białek *moonlighting* obecnych na powierzchni *C. albicans*: (i) enzymy metaboliczne, biorące udział nie tylko w glikolizie i glukoneogenezie, ale także w cyklu kwasów trójkarboksylowych, szlaku pentozofosforanowym lub innych konserwatywnych ewolucyjnie podstawowych szlakach metabolicznych, (ii) czynniki zaangażowane w syntezę białek, tj. czynniki elongacyjne i białka rybosomalne, oraz (iii) molekularne białka opiekuńcze i białka odpowiedzialne za odpowiedź komórek grzybów na warunki stresowe. Dla kilku białek *C. albicans*, szczególnie wywodzących się z tej pierwszej grupy, potwierdzano kilkakrotnie powierzchniową lokalizację i ich udział w oddziaływaniach z cząsteczkami gospodarza. Jednym z białek *moonlighting* identyfikowanych często na powierzchni komórek tego gatunku jest białko Tdh3, czyli dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH), katalizująca zamianę aldehydu 3-fosfoglicerynowego w 1,3-bisfosfoglicerynian w szóstym etapie szlaku glikolizy. Białko Tdh3 jest również wysoce immunogennym białkiem ściany komórkowej podczas ogólnoustrojowej kandydozy (Gil-Navarro i in., 1997), zaangażowanym także w wiązanie fibronektyny i lamininy (Gozalbo i in., 1998). Co ciekawe, wariant cząsteczki Tdh3 związanej ze ścianą komórkową reprezentuje około 20-35% całkowitej ilości tego enzymu w komórce *C. albicans*, a transport cząsteczki na powierzchnię komórki może być uwarunkowany obecnością konkretnej sekwencji aminokwasowej zlokalizowanej na N-końcu białka, która nie jest jednak typowym peptydem sygnałowym dla klasycznej ścieżki sekrecji (Delgado i in., 2003). Innym przykładem białka *moonlighting* identyfikowanym często na powierzchni różnych patogenów jest wspomniana wcześniej enolaza, której ważna rola w wiązaniu ludzkiego plazminogenu została potwierdzona dla gatunku *C. albicans*, a także innych grzybów patogennych dla ludzi – *Pneumocystis carinii* oraz *Paracoccidioides brasiliensis*, pasożytniczych pierwotniaków *Leishmania*, *Plasmodium falciparum*, *Trichomonas vaginalis*, a także przywry *Schistosoma bovis* i nicieni *Onchocerca volvulus* oraz *Dirofilaria immitis* (Seweryn i in., 2007).

Podsumowując, wiele dotychczasowych, udokumentowanych w literaturze naukowej obserwacji, przedstawionych łącznie w przygotowanej pracy przeglądowej **A1**, wskazuje, że

zjawisko występowania różnorodnych białek *moonlighting* na powierzchni komórek jest szeroko rozpowszechnione wśród wielu zróżnicowanych grup organizmów. Zatem, jeśli czynnikami wirulencji określa się, między innymi, cząsteczki eksponowane na powierzchni komórki patogenu i ułatwiające im inwazję i kolonizację organizmu gospodarza, to białka reprezentujące grupę *moonlighting proteins*, zaangażowane w interakcje z białkami macierzy zewnątrzkomórkowej, powierzchnią komórek gospodarza lub składnikami osoczowych kaskad proteolitycznych niewątpliwie należą do tej ważnej klasy biomolekuł, a ich liczna obecność na powierzchni komórek organizmów chorobotwórczych może być korzystna dla tych ostatnich, dając im przewagę w interakcji patogen-gospodarz.

### Ad.1.2

Biorąc pod uwagę szerokie rozpowszechnienie i częste występowanie nietypowych białek na powierzchni komórek różnego typu patogenów, w dalszym etapie badań rozpoczęłam analizę zestawu białek eksponowanych na powierzchni komórek grzybów drożdżopodobnych gatunków *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis*, które były hodowane w warunkach sprzyjających występowaniu różnych form morfologicznych (A2). Formę pojedynczych komórek, rozmnażających się przez pączkowanie, uzyskiwano dzięki hodowli w pożywce YPD, składającej się z 1% wyciągu z drożdży, 2% peptonu sojowego oraz 2% glukozy, pH 6,0, temperatura hodowli wynosiła 30°C. Natomiast hodowla w warunkach stymulujących filamentację, kiedy to grzyby z gatunku *C. parapsilosis* tworzyły pseudostrzępki (struktury zbudowane z wydłużonych komórek, które nie uległy separacji po podziale, przypominające kształtem strzępkę prawdziwą), a komórki *C. tropicalis* tworzyły strzępki prawdziwe i pseudostrzępki, była prowadzona w temperaturze 37°C w (i) pożywce RPMI 1640 o ściśle zdefiniowanym składzie, pH 7,4, zawierającej 0,2% glukozę lub (ii) pożywce YAPD, zawierającej 0,1% wyciąg z drożdży, 0,2% pepton zwierzęcy oraz 2% glukozę, która również stymulowała produkcję grzybiczych proteinaz zewnątrzkomórkowych. Aby wykluczyć możliwość zanieczyszczenia preparatów zawierających ściany komórkowe pozyskiwane z komórek drożdży poprzez ich mechaniczne rozbijanie, do identyfikacji białek wyekspozowanych na powierzchni komórek grzybów zastosowałam nową metodę (ang. *cell surface shaving with trypsin*) polegającą na bezpośrednim działaniu trypsyny – enzymu proteolitycznego stosowanego bardzo często w badaniach proteomicznych – na całe, nienaruszone komórki grzybów przez okres czasu tak dopasowany, aby białka prezentowane na powierzchni komórek uległy hydrolizie, a ich fragmenty zostały uwolnione do roztworu, natomiast komórki nie uległy dezintegracji. Po usunięciu komórek z mieszaniny, pozyskane fragmenty białek powierzchniowych były poddawane dalszej analizie z wykorzystaniem techniki proteomicznej *shotgun* oraz tandemowej spektrometrii mas sprzężonej z wysokosprawną chromatografią cieczową (LC-MS/MS). Owa metoda została z powodzeniem wykorzystana do analizy zestawu białek powierzchniowych komórek gatunku *C. albicans*, występujących w różnych formach morfologicznych przez Vialás i in. (2012). Półościowe oszacowanie względnej liczebności dla poszczególnych identyfikowanych białek było możliwe dzięki obliczeniu dla każdego białka znormalizowanego współczynnika częstości widmowej (NSAF, ang. *normalized spectral abundance factor*), gdzie całkowita liczba zliczeń widmowych (ang. *spectral count*) dla danego białka, podzielona przez długość białka (liczba aminokwasów) jest normalizowana poprzez podzielenie przez sumę ilorazów wyznaczonych

dla wszystkich białek zidentyfikowanych w eksperymencie w jednej próbce. Wysoka wartość współczynnika NSAF świadczy o wysokiej względnej liczebności cząsteczek danego białka w badanej próbce. Ta relatywnie szybka i prosta technika po raz pierwszy została wprowadzona do zasobu technik stosowanych przez nasz zespół badawczy podczas przygotowywania pracy **A2** i jest nadal często i skutecznie stosowana w różnych badaniach proteomicznych.

Zastosowanie techniki *cell surface shaving* w pracy **A2** pozwoliło na zidentyfikowanie 16, 9 i 12 białek powierzchniowych dla *C. parapsilosis* oraz 13, 13 i 10 białek powierzchniowych dla *C. tropicalis*, przypisanych do komórek hodowanych odpowiednio w pożywce YPD, YAPD i RPMI 1640. Przypisanie funkcji poszczególnym białkom umożliwiło określenie udziału wybranych funkcjonalnych grup w całej puli zidentyfikowanych białek powierzchniowych, i tak dla gatunku *C. parapsilosis* białka zaangażowane w komórkowy metabolizm stanowiły 25%, 33% i 17% wszystkich białek wykrytych dla komórek hodowanych odpowiednio w pożywkach YPD, YAPD i RPMI 1640, natomiast dla *C. tropicalis* było to odpowiednio 38%, 54% oraz 20% wszystkich białek. Uzyskane wyniki wskazują zatem, że białka *moonlighting*, które często należą do grupy białek zaangażowanych w metabolizm komórkowy, najliczniej występowały na powierzchni komórek hodowanych w pożywce YAPD, charakteryzującej się obniżoną zawartością źródła azotu, która przede wszystkim stymuluje produkcję wydzielniczych proteinaz. Jednakże w temperaturze 37°C i w pH 7,0 dochodzi w niej również do wytwarzania form filamentarnych, przede wszystkim pseudostrzępek, jednak w mniejszym stopniu niż ma to miejsce w pożywce RPMI 1640, która jest rutynowo wykorzystywana do stymulowania filamentacji. Co ciekawe, dla komórek hodowanych w pożywce YAPD zidentyfikowano również na ścianie komórkowej białka związane z odpowiedzią komórki na stres i owa grupa była reprezentowana najliczniej w tych warunkach w porównaniu do innych warunków hodowli, co częściowo koreluje z wynikami przedstawionymi przez Ramírez-Quijas i in. (2015) oraz Serrano-Fujarte i in., (2016), wskazującymi na liczną obecność *moonlighting proteins* na powierzchni komórek *Candida* w warunkach stresu oksydacyjnego.

Ponadto białka wywodzące się z cytoplazmy występowały również często na powierzchni pojedynczych, drożdżopodobnych komórek grzybów, jednakże były one także identyfikowane po hodowli w pożywce najsilniej stymulującej powstawanie strzępek i pseudostrzępek, czyli RPMI 1640. Niektóre z białek *moonlighting* występowały na powierzchni komórek we wszystkich badanych warunkach, tak jak białko Tdh3 *C. tropicalis*. Co istotne, powierzchniowa ekspozycja tego białka dodatkowo się zwiększyła podczas hodowli *C. tropicalis* w pożywce YPD lub RPMI 1640 z dodatkiem 10% ludzkiego osocza. Świadczy to o indukowaniu zwiększonej powierzchniowej obecności Tdh3 w warunkach kontaktu z białkami gospodarza oraz o potencjalnym zaangażowaniu tego białka w oddziaływanie patogenu z gospodarzem. Oprócz tego, na powierzchni komórek *C. tropicalis* zidentyfikowano następujące białka *moonlighting*: po hodowli w pożywce YPD były to Eno1, Tpi1, dekarboksylaza pirogronianowa (Pdc11), kinaza fosfoglicerynianowa (Pgc1); w pożywce YAPD Eno1, Pgc1, transketolaza (Tkl1), dehydrogenaza jabłczanowa (Mdh1), podjednostka syntazy ATP (Atp2), czynniki elongacji 3 (Cef3) i EF-1 $\alpha$  (Tef1); natomiast w pożywce RPMI dehydrogenaza alkoholowa 2. Dla gatunku *C. parapsilosis* po hodowli w pożywce YPD również zidentyfikowano białka Tdh3, Pdc11 oraz Eno1, a ponadto dehydrogenazę alkoholową 1 (Adh1), natomiast w pożywce YAPD wykazano obecność Eno1, Tdh3 oraz podjednostki

syntazy ATP (Atp1). Większość z tych białek została w innych badaniach wskazana również jako białka immunogenne, w tym Adh1, Atp1, Eno1, Tdh3 i Pdc11 dla *C. parapsilosis*, a dla *C. tropicalis* Atp2, Eno1, Tdh3 i Tpi1 (Lee i in., 2014a; 2014b). Wykorzystanie tych obserwacji może w przyszłości umożliwić opracowanie nowych, szybkich metod diagnostyki kandydoz oraz pomóc w opracowaniu skutecznych metod zapobiegania infekcjom grzybiczym, takich jak na przykład szczepionki wieloskładnikowe.

Oprócz nietypowych białek ściany komórkowej, na powierzchni komórek pochodzących z każdego testowanego warunków hodowli, w publikacji **A2** zidentyfikowano szereg typowych białek ściany komórkowej, w tym białka adhezyjne i enzymy odpowiedzialne za przebudowę ściany komórkowej. Zastosowana technika *cell surface shaving* pozwoliła również na wskazanie osoczowych białek ludzkich, jakie zostały zaadsorbowane do powierzchni komórek *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis* po hodowli grzybów w obecności 10% osocza ludzkiego. Wśród tych białek zidentyfikowano albuminę, apolipoproteiny, które należą do bardzo licznie reprezentowanych grup białek osocza, ale także inhibitor czynnika IIa kaskady krzepnięcia, alfa1-antytrypsynę, fibrynogen, fibronektynę, witronektynę, gelsolinę oraz składniki układu dopełniacza, co potwierdza bezpośrednie oddziaływanie powierzchni komórek dwóch badanych gatunków *Candida* z ważnymi białkami ludzkimi zaangażowanymi w odpowiedź immunologiczną oraz składnikami osoczowych kaskad proteolitycznych (**A2**).

### **Ad.1.3.**

Dalsze badania nad ekspozycją *moonlighting proteins* na powierzchni komórek grzybów *Candida*, przedstawione w publikacji **A3**, przeprowadzono również z wykorzystaniem techniki *cell surface shaving* dla trzech gatunków *Candida non-albicans*, w tym ponownie *C. tropicalis* oraz *C. parapsilosis*, a także *C. glabrata*, który to gatunek jest blisko spokrewniony z *Saccharomyces cerevisiae*, nie wytwarza strzępek prawdziwych ani pseudostrzępek, jednakowoż cechuje się stosunkowo często występującą opornością na leki przeciwgrzybicze, stąd jest również uważany za ważny grzybiczy patogen dla człowieka (Vale-Silva i Sanglard, 2015). Wybrane gatunki *Candida* były hodowane w pożywkach o zróżnicowanym składzie, który do pewnego stopnia naśladował mikrootoczenie komórek grzybów występujących w określonych niszach infekcyjnych w organizmie gospodarza. Były to następujące pożywki hodowlane: (i) chemicznie zdefiniowana pożywka syntetyczna na bazie aminokwasów (Lee, 1975), stosowana jako pożywka referencyjna (DS., ang. *defined synthetic medium*) (ii) pożywka o składzie przypominającym ślinę (AS, ang. *artificial saliva*), (iii) pożywka o składzie przypominającym płyn z dróg rodnych (VS, ang. *vagina-simulative medium*), (iv) pożywka o składzie przypominającym mocz (AU, ang. *artificial urine*), (v) pożywka YPD – hodowla prowadzona w warunkach beztlenowych, naśladowująca warunki panujące w dolnych odcinkach układu pokarmowego (AN, ang. *anaerobic*). Technika *cell surface shaving* została zastosowana w pracy **A3** ponownie, jednak z niewielkimi modyfikacjami, tak, aby wydłużyć czas hydrolizy fragmentów białek uwolnionych z powierzchni grzybów w roztworze pozbawionym już komórek i dzięki temu uzyskać więcej peptydów odpowiednich do analizy metodą LC-MS/MS. We właściwej analizie danych uzyskanych podczas identyfikacji grzybiczych białek powierzchniowych pomogły mi umiejętności, jakie zdobyłam podczas szkolenia *Bioinformatic resources for protein biology*, organizowanego przez EMBL-EBI w Wielkiej Brytanii, które dotyczyło możliwości



wykorzystywania baz danych i narzędzi udostępnianych przez EMBL-EBI do pozyskiwania informacji o białkach.

W pracy **A3** we wszystkich badanych warunkach hodowli, na powierzchni komórek grzybów zidentyfikowano łącznie 53 różne białka dla *C. glabrata*, 37 dla *C. parapsilosis* i 13 dla *C. tropicalis*, jednakże widoczne było dość znaczne zróżnicowanie pomiędzy liczbą białek zidentyfikowanych w poszczególnych warunkach. Największą liczbę białek wykryto dla każdego gatunku przy użyciu pożywki YPD w warunkach beztlenowych (AN) (29, 27 i 11 odpowiednio dla *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*). Najmniej białek *C. glabrata* (8) i *C. parapsilosis* (6) wykryto po wzroście w pożywce VS, a białek *C. tropicalis* po hodowli w pożywce AU (1). Po przypisaniu funkcji dla każdego zidentyfikowanego białka, skierowałam uwagę przede wszystkim na grupę białek *moonlighting* obecnych na powierzchni komórek poszczególnych gatunków grzybów. Białka *moonlighting* zostały wykryte na powierzchni komórek prawie wszystkich testowanych gatunków hodowanych w prawie każdej pożywce hodowlanej użytej w analizie i stanowiły co najmniej 25% całkowitej puli białek, jednak nie dotyczyło to hodowli *C. parapsilosis* w pożywce VS. Dalsze szczegółowe porównanie jakościowe podobieństw i różnic między kompletnymi zestawami białek powierzchniowych komórek zidentyfikowanych dla trzech badanych gatunków *Candida* przeprowadzono w celu określenia liczby białek powtarzających się między gatunkami. Trzy nietypowe białka ściany komórkowej – Pdc11, Eno1 i Tdh3 – były wskazane dla wszystkich trzech badanych gatunków, natomiast osiem białek powtarzało się w analizach dla *C. parapsilosis* i *C. glabrata*. Ponadto zidentyfikowano kilka białek, które wykryto wyłącznie dla gatunku *C. parapsilosis* (3) oraz *C. glabrata* (8).

W dalszej kolejności oszacowano ilościowo zmiany w ekspozycji poszczególnych białek *moonlighting* po hodowli komórek w pożywkach symulujących różne nisze w organizmie gospodarza, które mogą być zasiedlane przez grzyby (VS, AS, AU, AN), a obserwowane zmiany porównano do komórek hodowanych w pożywce referencyjnej (DS). Dla *C. glabrata* wykryto osiem białek *moonlighting* po hodowli zarówno w pożywce DS, jak i w co najmniej jednej innej pożywce, a także zaobserwowano znaczny wzrost w ilości dla pięciu białek obecnych na powierzchni komórki w odniesieniu do warunków referencyjnych. Co więcej, 11 dodatkowych białek *moonlighting* wykryto dla komórek *C. glabrata* po hodowli w pożywkach AS, VS, AU lub warunkach beztlenowych (AN), ale nie w pożywce referencyjnej. W przypadku komórek *C. parapsilosis* hodowlanych w pożywce referencyjnej wykryto tylko cztery białka *moonlighting*, a po hodowli w warunkach AS, AU lub AN zidentyfikowano dodatkowe 10 nietypowych białek ściany komórkowej. Na powierzchni komórek *C. tropicalis* wykryto tylko trzy białka *moonlighting* (Pdc11, Eno1 i Tdh3), między innymi, gdy grzyby te hodowano w pożywkach DS i w AN – i dla tych warunków poziom liczebności białek był zbliżony. Natomiast znacząco zwiększoną liczebność dwóch białek *moonlighting* na powierzchni komórek *C. tropicalis* zaobserwowano po wzroście w pożywkach naśladujących warunki gospodarza: Eno1 w AS i AU, a Tdh3 w VS. Podsumowując, z przedstawionych obserwacji wynika, że białka *moonlighting* nie tylko są obecne na powierzchni grzybów wzrastających w bardzo różnorodnych warunkach, ale, co istotne, podczas kontaktu ze środowiskiem gospodarza ich powierzchniowa ekspozycja może się zmieniać oraz zwiększać, co przemawia za hipotezą, że jest ona procesem nieprzypadkowym.

Co ważne, w badaniach opisanych w publikacji **A2** i omawianych powyżej, białka Pdc11, Eno1 i Tdh3 zidentyfikowano również na powierzchni komórek *C. parapsilosis* oraz *C. tropicalis* hodowanych w warunkach tlenowych w pożywce YPD, a Tdh3 także w pożywce YAPD, co podkreśla powszechną obecność białek Pdc11, Eno1 i Tdh3 na ścianie komórkowej badanych gatunków grzybów. W badaniach przeprowadzonych przez Reyna-Beltrán i in., (2018) przypisano enolazie obecnej na powierzchni komórek *C. albicans* aktywność transglutaminazy, polegającą na sieciowaniu białek ściany komórkowej poprzez reakcję transamidacji między łańcuchami bocznymi reszt Gln i Lys, w wyniku czego powstają wiązania amidowe N- $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lizyny, co potwierdza ważną rolę tego białka w utrzymaniu integralności ściany komórkowej, w przemianach morfologicznych komórek grzybów oraz w ochronie przed stresem osmotycznym.

### **Ad.2.1.**

Mimo, że obecność *moonlighting proteins* na powierzchni grzybów z rodzaju *Candida* została potwierdzona licznymi badaniami, nadal nie zostały w pełni wyjaśnione mechanizmy transportu nietypowych białek ściany komórkowej na zewnątrz komórki, jako że nie zawierają one typowego peptydu sygnałowego kierującego je na klasyczną ścieżkę sekrecji. Jedną z hipotez wyjaśniających to zjawisko jest możliwość transportu białek *moonlighting* we wnętrzu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs, ang. *extracellular vesicles*), czyli struktur o rozmiarach rzędu od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów, otoczonych dwuwarstwą lipidową oraz zawierających bardzo zróżnicowaną zawartość, obejmującą białka, polisacharydy, kwasy nukleinowe, lipidy, toksyny oraz inne drobnocząsteczkowe związki organiczne (Nickel i Seedorf, 2008). Ową hipotezę przytoczyłam także w publikacji **A1**, natomiast w roku 2015 zostały opublikowane dwie publikacje doświadczalne przygotowane przez zespoły Gil-Bona i in. oraz Vargas i in., w których zidentyfikowano wiele przykładów *moonlighting proteins* przenoszonych przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe produkowane przez gatunek *C. albicans*. Wśród wskazanych białek znajdowały się, między innymi Tdh3, Eno1, Pgl1, Pgm1 i transaldolaza Tal1 (Gil-Bona i in., 2015; Vargas i in., 2015). Jako że w literaturze pojawiła się również wzmianka o zaobserwowaniu EVs dla gatunku *C. parapsilosis* (Albuquerque i in., 2008), w dalszych badaniach podjęłam próbę pozyskania EVs produkowanych przez komórki *Candida non-albicans*. Aby dokładnie poznać technikę izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wzięłam udział w szkoleniu *Extracellular Vesicles: From Biology to Biomedical Applications*, organizowanym przez EMBL w Niemczech, podczas którego zdobyłam wiedzę i umiejętności dotyczące pozyskiwania i analizy EVs produkowanych przez komórki eukariotyczne, zgodne z obowiązującymi zasadami wyznaczonymi przez *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV). Metodę pozyskiwania EVs produkowanych przez grzyby drożdżopodobne oparta na sekwencyjnym wirowaniu wprowadziłam następnie do zasobu metod stosowanych w naszym zespole badawczym w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky – jest ona nadal z powodzeniem wykorzystywana podczas realizacji różnych projektów badawczych.

W publikacji **A4** po raz pierwszy scharakteryzowaliśmy EVs wytwarzane przez grzyby drożdżopodobne gatunków *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*, ze szczególnym uwzględnieniem proteomu pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W badaniach prowadzonych we współpracy z prof. dr hab. Elżbietą Pyzą i dr inż. Olgą Barczyk-Woźnicką z Zakładu

Biologii i Obrazowania Komórki Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Wydziału Biologii UJ wykonano obrazowanie pozyskanych preparatów pęcherzyków z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), co pozwoliło przede wszystkim na jednoznaczne potwierdzenie obecności w uzyskanej próbce kulistych struktur o rozmiarze od kilkudziesięciu do kilkuset nanometrów, otoczonych dwuwarstwą lipidową, co koreluje z charakterystyką EVs. Zmierzone także stężenie fosfolipidów i białek w pozyskanych preparatach, a uzyskane wyniki bezsprzecznie wykazały obecność głównych składników budujących pęcherzyki. Następnie w badaniach prowadzonych we współpracy z prof. dr hab. Ewą Zubą-Surma oraz dr Elżbietą Karnas z Zakładu Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ przy zastosowaniu techniki analizy śledzenia nanocząstek (NTA, ang. *nanoparticle tracking analysis*) oszacowano liczbę pęcherzyków zawartych w pozyskanej próbce EVs: dla *C. glabrata* liczbę EVs określono na  $2,55 \pm 0,17 \times 10^{10}$ , natomiast dla *C. parapsilosis* było to  $2,3 \pm 0,08 \times 10^{10}$ , a dla *C. tropicalis*  $8,88 \pm 0,63 \times 10^9$  wyprodukowanych odpowiednio przez  $4 \times 10^{10}$ ,  $10 \times 10^{10}$  i  $4 \times 10^{10}$  komórek grzybów. Korzystając z tej samej techniki wyznaczono również średnie rozmiary grzybiczych pęcherzyków, wynosiły one odpowiednio  $139,5 \pm 7,7$  nm,  $84,65 \pm 11,65$  nm i  $90,65 \pm 3,05$  nm dla *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*.

Aby scharakteryzować skład zestawu białek transportowanych przez EVs, przeprowadziłam identyfikację białek za pomocą techniki LC-MS/MS wraz z próbą wskazania lokalizacji poszczególnych cząsteczek w obrębie struktury pęcherzyka (obecność białka na powierzchni pęcherzyka, w jego wnętrzu, bądź zasocjowanie z membraną pęcherzyka). W pierwszym kroku analizy białka eksponowane na powierzchni EVs *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* zidentyfikowałam za pomocą techniki *surface shaving with trypsin*, stosowanej uprzednio również do analizy powierzchni całych komórek grzybów, którą to metodę dostosowałam także do badania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W kolejnym kroku analizy, grzybicze EVs zostały również poddane działaniu ultradźwięków w celu zniszczenia integralności ich błony lipidowej i wzbogacenia próbki w białka zawarte we wnętrzu pęcherzyków, które następnie po usunięciu pozostałości membran EVs poddano hydrolizie trypsyną. Jednakże w tej grupie cząsteczek zidentyfikowano również kilka białek funkcjonalnie powiązanych z błoną i ścianą komórkową, co wskazuje, że mogły one ulec fragmentacji i odłączyć się od powierzchni pęcherzyka podczas procedury izolacji białek. Niemniej jednak, biorąc pod uwagę fakt, że białka transbłonowe lub białka zakotwiczone w błonie mogą być trudne do zidentyfikowania przy użyciu dwóch wyżej wymienionych metod, osady zawierające pozostałości błon pęcherzyków zebrano poprzez wirowanie przy wysokiej prędkości i poddano dodatkowej hydrolizie za pomocą trypsyny po uprzednim wyekstrahowaniu białek z użyciem detergentu i odczynnika redukującego. W badanych próbkach zidentyfikowano łącznie 42 białka dla *C. glabrata*, 33 dla *C. parapsilosis* i 34 dla *C. tropicalis*. Z tego 32, 22 i 30 z tych białek było białkami eksponowanymi na powierzchni pęcherzyków, odpowiednio gatunku *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*. Trzy dodatkowe białka dla *C. glabrata* i *C. tropicalis* oraz 10 dla *C. parapsilosis* zostały też zidentyfikowane po procedurze dezintegracji pęcherzyków. Rozszerzenie procedury o kolejny krok identyfikacji białek zasocjowanych z membranami pęcherzyków pozwoliło na identyfikację siedmiu białek błonowych z EVs *C. glabrata* i po jednym białku zakotwiczonym w membranie dla pozostałych dwóch gatunków, tj. białka Pga17 (ang. *putative GPI-anchored protein*) dla *C. parapsilosis* oraz mannoproteiny–adhezyny Flo9 dla *C. tropicalis*. Obecność

mannoprotein na powierzchni pęcherzyków została także potwierdzona z wykorzystaniem wysokorozdzielczej cytometrii przepływowej dedykowanej do analizy EVs, po uprzednim wyznakowaniu EVs skoniugowaną z fluoresceiną konkanawaliną A, lektyną rozpoznającą glikokoniugaty zawierające mannozę. Ta część badań została wykonana również we współpracy z Zakładem Biologii Komórki WBBiB UJ.

Wśród białek EVs zidentyfikowano białka zaangażowane w przebudowę ściany komórkowej, transport i organizację błony komórkowej, metabolizm komórkowy, transkrypcję i translację, odpowiedź komórki na stres a także czynniki wirulencji oraz dość liczne białka o nierozpoznanej funkcji (A4). Dla dwóch z badanych gatunków białka zaangażowane w komórkowy metabolizm stanowiły najliczniejszą grupę zidentyfikowanych białek (31% dla *C. glabrata* i 32% dla *C. tropicalis*) i drugą pod względem liczności dla *C. parapsilosis* (18%). Wśród tej grupy białek, dehydrogenaza alkoholowa Adh1 była białkiem zidentyfikowanym dla EVs wszystkich trzech gatunków, a białka Eno1, Tdh3, Pgc1 oraz kinaza pirogronianowa Cdc19 zostały zidentyfikowane dla EVs *C. tropicalis* i *C. glabrata*, z czego większość była obecna nie tylko we wnętrzu, ale również na powierzchni pęcherzyków. Dodatkowo, dla *C. glabrata* licznie reprezentowane były białka zaangażowane w translację (14%). Wśród białek *moonlighting* zidentyfikowanych w pęcherzykach *C. glabrata* i związanych z metabolizmem wewnątrzkomórkowym znalazły się również karboksykinaza fosfo-enolopirogronianowa Pck1, aldolaza fruktozobisfosforanowa Fba1, dekarboksylaza pirogronianowa Pdc1 oraz dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa Gnd1, natomiast dla *C. tropicalis* również dehydrogenaza alkoholowa Adh2.

Jako że jedną z hipotez opisujących mechanizm powstawania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych grzybów jest uwypuklanie błony komórkowej i odrywanie powstałego w ten sposób pęcherzyka na zewnątrz komórki, mogłoby w ten sposób dochodzić do włączenia części cytozolu wraz z białkami cytoplazmatycznymi do wnętrza pęcherzyków i ich transportu na zewnątrz komórki. Ponadto, w przypadku enolazy pochodzącej z komórek eukariotycznych zaobserwowano jej powinowactwo do lipidów, co może skutkować asocjowaniem tego białka do błony komórkowej, czy też do błon budujących wewnątrzkomórkowe organelle (Didiasova i in., 2019), natomiast w komórkach *S. cerevisiae* pewna pula cząsteczek enolazy została zidentyfikowana również w wakuolach (Decker i Wickner, 2006). Biorąc pod uwagę fakt, że mechanizmy biogenezy grzybiczych EVs mogą być powiązane z przemodelowaniem i aktywnością tych różnorodnych struktur wewnątrzkomórkowych (Bielska i May, 2019), można przyjąć hipotezę, że wewnątrzkomórkowe białka pozbawione peptydu sygnałowego dla klasycznej drogi ścieżki sekrecji mogą przedostawać się również do tworzonych wewnątrz komórki pęcherzyków i tym sposobem być wydzielane na zewnątrz komórki. Osiągnięcie zewnątrzkomórkowej lokalizacji przez białka wewnątrzkomórkowe może zależeć od różnych mechanizmów niekonwencjonalnej sekrecji, w tym produkcji EVs, ale też może być związane z obecnością tych białek w bliskiej lokalizacji żywych komórek, spowodowaną śmiercią lub zniszczeniem innych komórek, co jest założeniem również racjonalnym, jako że taka sytuacja może mieć miejsce w skomplikowanych, wielokomórkowych społecznościach mikroorganizmów jakimi są biofilmy.

## Ad.2.2.

W dotychczasowych badaniach (A2, A3) wykazano, że różne białka *moonlighting* mogą być obecne na powierzchni komórek grzybów z gatunków *Candida non-albicans*, a potencjalna droga ich wydzielania na zewnątrz komórki może polegać na produkcji EVs (A4). Podobne obserwacje były także wcześniej dokonywane dla komórek *C. albicans* (Hernández i in., Vialás i in., 2012; Vargas i in., 2015; Gil-Bona i in., 2015), zatem można teraz przyjąć, że jest to zjawisko rozpowszechnione i wspólne dla różnych gatunków patogenów z rodzaju *Candida*. W dalszych badaniach podjęto zatem próbę wyjaśnienia mechanizmu deponowania na powierzchni komórek *C. albicans* jednego z najlepiej jak dotąd opisanych grzybiczych białek *moonlighting*, jakim jest enolaza, traktując ten układ badawczy z jednej strony jako model oddziaływania pomiędzy nietypowymi białkami powierzchniowymi a ścianą komórkową grzybów, natomiast z drugiej strony koncentrując się na wskazaniu szczegółowych mechanizmów interakcji dla dwóch konkretnych białek *C. albicans* (A5). W pierwszym etapie badań, korzystając z techniki *cell surface shaving* oraz spektrometrii mas (LC-MS/MS) wykazano, że enolaza jest obecna na powierzchni komórek *C. albicans* hodowanych w różnych warunkach, w tym w pożywce YPD, AS, AU i VS i nie zauważono statystycznie istotnych różnic w ilości tego białka pomiędzy badanymi komórkami, zatem można uznać, że jej powierzchniowa ekspozycja jest zjawiskiem generalnym. Potwierdziły to również dalsze obserwacje, oparte na immunodetekcji enolazy obecnej na powierzchni komórek *C. albicans* hodowanych w obecności grzybiczych czynników quorum sensing (QS): farnesolu i kwasu farnelowego, bakteryjnej cząsteczki QS, czyli autoinduktora AI-2, lipopolisacharydu lub nadtlenu wodoru – czyli w warunkach, jakie mogą panować w miejscu mieszanej infekcji grzybiczo-bakteryjnej czy w biofilmie. Obecność enolazy stwierdzono na ścianie komórkowej we wszystkich tych warunkach hodowli na wysokim, ale porównywalnym poziomie, również w odniesieniu do komórek hodowanych w pożywce referencyjnej. Kolejnym krokiem było porównanie poziomu powierzchniowej ekspozycji enolazy dla pojedynczych komórek *C. albicans* oraz dla komórek tworzących strzępki prawdziwe. W tym celu zastosowano równoległe obrazowanie mikroskopowe z wykorzystaniem przeciwciał pierwszorzędowych skierowanych przeciwko enolazie drożdżowej oraz przeciwciał drugorzędowych znakowanych fluoresceiną oraz kolorymetryczny test ELISA z zastosowaniem przeciwciał drugorzędowych sprzężonych z peroksydazą chrzanową. Wyniki obu podejść eksperymentalnych jednoznacznie potwierdziły, że enolaza jest obecna na powierzchni obu form morfologicznych, przy czym jednak większa ilość enolazy jest zdeponowana na powierzchni komórek występujących w formie strzępkowej, co wskazuje na preferencję dla tej formy morfologicznej.

W celu zweryfikowania hipotezy o możliwości readsorpcji enolazy znajdującej się w otoczeniu komórek do ich powierzchni, wykorzystano w dalszych badaniach enolazę z cytoplazmy komórek *C. albicans* oczyszczoną zgodnie z metodyką stosowaną w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky WBBiB UJ z wykorzystaniem sekwencji technik chromatograficznych (II.3.10). Zarówno obrazowanie mikroskopowe z wykorzystaniem enolazy znakowanej fluoresceiną, jak i mikropłytkowy test kolorymetryczny na wiązanie ligandu z użyciem enolazy sprzężonej z biotyną jednoznacznie potwierdziły zjawisko wiązania się zewnątrzkomórkowej enolazy do powierzchni strzępek *C. albicans*. Stąd istotnym, kolejnym etapem badań było wskazanie składnika ściany komórkowej strzępek odpowiedzialnego za powierzchniowe ulokowanie enolazy. Z wykorzystaniem chromatografii

powinowactwa oraz techniki sieciowania chemicznego wskazałam kilka białek ściany komórkowej, które potencjalnie mogły być białkami wiążącymi enolazę, a w tej grupie znalazło się typowe białko ściany komórkowej, adhezyna Als3. Dzięki współpracy nawiązanej z prof. Angelą H. Nobbs z Bristol Dental School, University of Bristol z Wielkiej Brytanii w dalszych etapach badań mogłam wykorzystać komórki drożdży *S. cerevisiae* z nadprodukcją kilku najważniejszych adhezyn *C. albicans*: białka Als3, Hwp1 i Eap1. Największą zdolność wiązania enolazy wykazano dla białka Als3, potwierdzając tym samym wcześniejsze obserwacje, podczas gdy inne badane białka – Eap1 i Hwp1 – miały znacznie mniejszy wkład w interakcje z enolazą na powierzchni komórek drożdży. Jest to pierwsza informacja o możliwym mechanizmie prezentacji enolazy na powierzchni komórki grzyba z udziałem typowych adhezyn grzybów oraz możliwe wyjaśnienie lokalizacji enolazy na powierzchni *C. albicans*. Zweryfikowanie oddziaływania enolazy z adhezyną Als3 było możliwe po uzyskaniu ze ściany komórkowej białka Als3, oczyszczonego zgodnie z procedurą stosowaną w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky WBBiB UJ (II.3.10). Oba białka wykorzystano do wyznaczenia kinetycznych i fizykochemicznych parametrów ich interakcji z użyciem technologii optycznej wykorzystującej zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*). Wyznaczona równowagowa stała dysocjacji  $K_D$  dla oddziałującej pary Als3–Eno1 wynosiła  $3,67 \times 10^{-8}$  M, co wskazuje na wysokie powinowactwo pomiędzy białkami. Prawidłową analizę zjawiska wiązania enolazy do adhezyny Als3 ułatwiły mi umiejętności zdobyte podczas kursu *Ligand-binding Theory and Practice 2016* organizowanego przez Federację Europejskich Towarzystw Biochemicznych (FEBS), który odbywał się w Czechach. Następnie, ponownie wykorzystując komórki drożdży *S. cerevisiae* z nadprodukcją różnych wariantów białka Als3 *C. albicans*, pozbawionych poszczególnych fragmentów cząsteczki wykazano, że przede wszystkim N-końcowy fragment cząsteczki Als3 (aa166–225, aa218–285, aa270–305 oraz 277–286) oraz centralna domena TR z powtórzeniami tandemowymi (aa434–830) są zaangażowane w interakcje z enolazą, natomiast fragment związany z formowaniem amyloidu (aa325–331) nie bierze udziału w oddziaływaniach. Zważywszy na fakt, że N-końcowy fragment cząsteczki Als3 jest również wskazywany jako miejsce wiązania ligandów gospodarza, a oba badane białka grzybicze zostały wskazane w publikacji A5 oraz w pracy II.3.5 jako białka wiążące ludzki plazminogen (HPG) i kininogen wielkocząsteczkowy (HK), w pracy A5 zweryfikowano również wpływ wzajemnych oddziaływań pomiędzy oboma białkami grzybiczymi i białkami ludzkimi i wykazano, że wiązanie enolazy do adhezyny Als3 na powierzchni komórki grzybów może być ważnym mechanizmem modulowania interakcji pomiędzy gospodarzem a patogenem w trakcie infekcji wywołanych przez *C. albicans*.

Powszechna i liczna obecność różnych *moonlighting proteins* na powierzchni komórek grzybów z rodzaju *Candida* hodowanych w różnych warunkach oraz w postaci różnych form morfologicznych, obserwowany wzrost częstości występowania tych białek na powierzchni w warunkach naśladujących miejsca potencjalnej infekcji w organizmie gospodarza oraz istotne dowody na udział wielu z tych konkretnych białek w fizjologii komórek grzybów oraz w interakcji patogen-gospodarz świadczą o niezwykle istotnym znaczeniu funkcji pełnionych na powierzchni komórki patogenów przez te cząsteczki.

W mojej opinii najistotniejszym rezultatem przedstawionego osiągnięcia naukowego jest zatem potwierdzenie zróżnicowania ekspozycji białek *moonlighting* na powierzchni komórek gatunków *Candida non-albicans* w zależności od warunków środowiskowych, co wskazuje, że jest to proces nieprzypadkowy, oraz zidentyfikowanie jednego ze sposobów transportu *moonlighting proteins* poza komórkę, a także specyficznego mechanizmu ich lokowania na powierzchni ściany komórkowej *Candida*.

Za najważniejsze wyniki wchodzące w skład osiągnięcia naukowego uważam:

1. wskazanie i omówienie dowodów obecności białek *moonlighting* na powierzchni komórek różnych eukariotycznych organizmów chorobotwórczych ze wskazaniem ich udziału w patogenezie zakażeń (A1),
2. podkreślenie istotnej roli *moonlighting proteins* w infekcjach grzybiczych wywołanych przez *C. albicans* i zaznaczenie konieczności prowadzenia dalszych badań dotyczących mechanizmów związanych z osiągnięciem przez nie powierzchniowej lokalizacji (A1),
3. potwierdzenie obecności *moonlighting proteins* na powierzchni różnych form morfologicznych gatunków *C. tropicalis* i *C. parapsilosis*, z czego najczęściej identyfikowane były dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego Tdh3, enolaza Eno1 oraz dekarboksylaza pirogronianowa Pdc11 (A2, A3),
4. wskazanie możliwej korelacji powierzchniowej obecności *moonlighting proteins* *C. tropicalis* i *C. parapsilosis* z reakcją komórki na stres środowiskowy oraz w odpowiedzi na obecność białek gospodarza (A2),
5. potwierdzenie zaangażowania białek *moonlighting*, wraz z innymi, typowymi białkami ściany komórkowej, w oddziaływania z białkami ludzkimi (A2, A5),
6. potwierdzenie obecności różnorodnych białek *moonlighting* na powierzchni komórek *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* i *C. glabrata* w warunkach naśladujących warunki panujące w niszach organizmu gospodarza, gdzie najczęściej występują grzyby z rodzaju *Candida* wywołując infekcje, oraz wykazanie zwiększenia obecności białek *moonlighting* na powierzchni komórek tych grzybów w odpowiedzi na warunki panujące w organizmie gospodarza (A3),
7. wyizolowanie i charakterystyka pęcherzyków zewnątrzkomórkowych wytwarzanych przez grzyby drożdżopodobne gatunków *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis*, ze szczególnym uwzględnieniem identyfikacji proteomu EVs (A4),
8. wskazanie procesu sekrecji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako drogi transportu *moonlighting proteins* gatunków *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. tropicalis* na zewnątrz komórki oraz wskazanie enzymów Adh1, Eno1 i Tdh3 jako białek często występujących w EVs produkowanych przez grzyby z rodzaju *Candida* (A4),

9. potwierdzenie powszechnej obecności enolazy na powierzchni komórek *C. albicans* hodowanych w zróżnicowanych warunkach, w tym naśladujących miejsce mieszanej infekcji, ze szczególną preferencją do występowania na powierzchni formy strzępkowej grzybów (A5),
10. potwierdzenie możliwości readsorpcji pozakomórkowej enolazy do powierzchni strzępek *C. albicans* i wskazanie typowego białka ściany komórkowej Als3 jako białka wiążącego enolazę na ścianie komórkowej (A5),
11. wskazanie możliwości modulowania przez enolazę oddziaływań pomiędzy typową adhezyną ściany komórkowej Als3 a ludzkimi osoczowymi białkami – HPG i HK (A5).

### 4.3.3. Dalsze plany badawcze

Rozpowszechnione występowanie nietypowych białek powierzchniowych, wykazane dla różnych gatunków grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida*, uzasadnia konieczność prowadzenia dalszych badań nad udziałem tych czynników w wirulencji grzybów oraz nad mechanizmami związanymi z osiąganiem przez nie powierzchniowej lokalizacji. W związku z tym, moje dalsze plany badawcze w tej tematyce dotyczą frakcjonowania i izolacji poszczególnych organelli komórkowych z komórek *C. albicans*, *C. tropicalis* oraz *C. glabrata*, w tym wakuoli, mitochondriów oraz frakcji retikulum endoplazmatycznego, które mogą mieć istotne znaczenie w biogenezie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Identyfikacja wybranych białek grzybiczych w określonych organellach komórkowych może stanowić cenne uzupełnienie dostępnej aktualnie wiedzy dotyczącej transportu białek *moonlighting* we wnętrzu EVs oraz może poszerzyć znajomość mechanizmów powstawania tych struktur i procesu wewnątrzkomórkowego sortowania białek przenoszonych jako zawartość pęcherzyków. Jak dotąd niewiele jest informacji dotyczących tych procesów odbywających w się w komórkach drożdży. W celu zapoznania się z metodyką izolacji frakcji zawierających poszczególne organelle komórkowe odbyłam miesięczne szkolenie na Uniwersytecie Karola w Pradze podczas stażu naukowego w programie wymiany osobowej naukowców organizowanej przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej. Podczas pobytu szkoleniowego w Zakładzie Biochemii Wydziału Nauk Przyrodniczych pod kierunkiem Doc. RNDr. Olgi Heidingsfeld poznałam techniki pozyskiwania frakcji zawierających ściany komórkowe, błony cytoplazmatyczne, retikulum endoplazmatyczne oraz wakuole z komórek *C. albicans*, które to umiejętności będą mogła wykorzystać w dalszych badaniach dotyczących mechanizmów transportu *moonlighting* proteins. Kolejną istotną kwestią jest również poznanie mechanizmu uwalniania zawartości pęcherzyków zewnątrzkomórkowych po ich transporcie poza komórkę i odpowiedź na pytania, czy jest to proces losowy, czy indukowany zewnątrzkomórkowymi czynnikami lub warunkami, jakie to są czynniki i jak mogłyby one wpływać na deponowanie cząsteczek zawartych w EVs na powierzchni ściany komórkowej. W perspektywie dalszej działalności badawczej uwzględniłam również próbę wyjaśnienia mechanizmów lokowania innych białek *moonlighting* na powierzchni komórek grzybów *C. albicans*, na przykład



dehydrogenazy alkoholowej czy kinazy fosfoglicerynianowej, ze wskazaniem czy istnieje możliwość readsorpcji tych białek do powierzchni komórki grzybów i próbą identyfikacji cząsteczek, które mogą służyć dla nich jako białka wiążące. Co więcej, dalsze badania są również wymagane w celu wskazania, czy dla enolazy pochodzącej z innych gatunków *Candida*, w tym *C. tropicalis* oraz *C. glabrata* również dochodzi do jej wiązania na powierzchni komórek za pośrednictwem typowych białek ściany komórkowej oraz identyfikacja konkretnych białek odpowiedzialnych za to zjawisko.

Dodatkowym zagadnieniem wymagającym badań jest wyjaśnienie udziału *moonlighting proteins* w wirulencji grzybów *Candida*, szczególnie dla gatunków *non-albicans*, ponieważ jak dotąd większość badań poświęconych udziałowi poszczególnych nietypowych białek ściany komórkowej w oddziaływaniu z białkami gospodarza dotyczyła gatunku *C. albicans*, a jedynie nieliczne doniesienia identyfikowały zaangażowanie wybranych *moonlighting proteins* innych gatunków w wiązanie białek gospodarza (w tym badania prowadzone w naszej grupie badawczej opublikowane w pracach **II.3.9**, **II.3.11**, **II.3.13**). W dalszej perspektywie badawczej planuję także weryfikację hipotezy o udziale wielocząsteczkowych kompleksów utworzonych przez różne białka pochodzenia wewnątrzkomórkowego na powierzchni komórek grzybów, w interakcjach z białkami oraz komórkami ludzkimi. Jak wykazano, enolaza, dehydrogenaza aldehydu-3-fosfoglicerynowego, kinaza fosfoglicerynianowa oraz mutaza fosfoglicerynianowa są w stanie w cytoplazmie tworzyć kompleksy, co ułatwia i przyspiesza przebieg glikolizy w komórkach (Seweryn i in., 2007), zatem można by przypuszczać, że możliwość gromadzenia białek w kompleksy na ścianie komórkowej może mieć również wpływ na ich oddziaływania z innymi cząsteczkami wchodzącymi w kontakt z komórką.

Jako że *moonlighting proteins* stanowią istotną część zestawu białek przenoszonego przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe, obok pozostałych cząsteczek odpowiedzialnych za wirulencję patogenów oraz zaangażowanych w międzykomórkową komunikację, w dalszych badaniach planuję analizę funkcjonalności tych struktur produkowanych przez grzyby z rodzaju *Candida* tworzące biofilmy. W naszym zespole badawczym aktualnie kontynuowane są prace nad właściwościami pęcherzyków zewnątrzkomórkowych gatunków *Candida non-albicans* oraz *C. albicans* w odniesieniu do charakterystyki EVs produkowanych przez biofilm grzybiczy (**II.3.22**) oraz ich wpływu na komórki ludzkie. W swoich dalszych planach badawczych zamierzam sprawdzić wpływ pęcherzyków grzybiczych na proces tworzenia i rozpraszania biofilmu przez różne gatunki *Candida*, udział EVs w wykształcaniu oporności na leki przeciwgrzybicze oraz w oddziaływaniach z ludzkimi komórkami nabłonka. Wstępne badania dotyczące tej tematyki przeprowadziłam w ramach realizacji pojedynczego działania badawczego w kierowanym przeze mnie projekcie MINIATURA finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki. Kolejne prace doświadczalne dotyczące zagadnień związanych z funkcjonalnością pęcherzyków zewnątrzkomórkowych są zaplanowane jako zadania badawcze w kierowanym przeze mnie projekcie SONATA finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki zatytułowanym „Wpływ grzybiczych i bakteryjnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na mechanizmy formowania biofilmu przez patogenne grzyby z rodzaju *Candida*”, którego realizacja jest zaplanowana do roku 2025.

#### 4.3.4. Omówienie pozostałej aktywności naukowo-badawczej

##### 4.3.4.1. Powierzchniowe białka adhezyjne *Candida* i ich oddziaływania z białkami gospodarza

Badania czynników wirulencji grzybów drożdżopodobnych z rodzaju *Candida* rozpoczęłam podczas realizacji mojej pracy magisterskiej, której tematem było wiązanie kininogenu wysokocząsteczkowego i niskocząsteczkowego przez wybrane gatunki rodzaju *Candida*, wykonywanej w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rapały-Kozik. Owe badania wpisywały się w zainicjowaną w tym samym czasie pracę badawczą realizowaną przez zespół pracujący pod kierunkiem prof. dr hab. Marii Rapały-Kozik oraz prof. dr hab. Andrzeja Kozika w Zakładzie Biochemii Analitycznej Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, oraz w latach późniejszych także w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky tego samego wydziału, dotyczącą różnych aspektów i molekularnych mechanizmów patogenezы zakażeń grzybiczych wywoływanych przez grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*. W roku 2009 przygotowaliśmy publikację przeglądową, w której omówiłam najważniejsze czynniki wirulencji trzech gatunków grzybów – w tym *C. albicans* – stanowiących istotne zagrożenie dla człowieka (II.3.6), natomiast w roku 2015 opublikowana została praca przeglądowa, w której podsumowałam aktualny stan badań proteomu ściany komórkowej patogennych grzybów oraz wskazałam dostępne na ten czas dane dotyczące identyfikacji białek w grzybiczych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (II.3.24).

W pierwszych etapach prac badawczych, realizowanych po rozpoczęciu przeze mnie studiów doktoranckich w 2007 roku, wykazano, że składniki osoczowego układu produkcji kinin mogą ulegać adsorpcji na powierzchni komórek grzybów z rodzaju *Candida*, co zdecydowanie ułatwiało aktywację tegoż układu i produkcję wazoaktywnych i prozapalnych peptydów – kinin, niezmiernie istotnych w dalszym przebiegu infekcji (II.3.1, II.3.2). Prace te były następnie kontynuowane w celu identyfikacji białek zlokalizowanych na powierzchni komórek *C. albicans*, bezpośrednio zaangażowanych w oddziaływania z ludzkim kininogenem wielkocząsteczkowym (II.3.5) oraz z pozostałymi białkami układu kontaktu – prekalikreina osoczną i czynnikiem kaskady krzepnięcia XII (FXII) (II.3.10). W badaniach realizowanych w naszym zespole badawczym wybrane białka ściany komórkowej – zarówno typowe białka adhezyjne jak i *moonlighting proteins* – zostały wyizolowane ze ściany komórkowej *C. albicans* przy użyciu enzymu  $\beta$ -1,3-glukanazy i  $\beta$ -1,6-glukanazy, a następnie oczyszczone z mieszaniny z wykorzystaniem sekwencji technik chromatograficznych, a ich powinowactwo do ludzkich białek układu produkcji kinin zostało potwierdzone dzięki analizie kinetycznych i termodynamicznych parametrów wiązania z użyciem technologii optycznej wykorzystującej zjawisko powierzchniowego rezonansu plazmonowego (SPR, ang. *surface plasmon resonance*). Wśród badanych białek *C. albicans* znalazły się typowa adhezyna Als3, a także *moonlighting proteins* – izomeraza triozofosforanowa Tpi1, enolaza Eno1, mutaza fosfoglicerynianowa Gpm1 i izomeraza glukozo-6-fosforanowa Gpi1. Następnie w dwóch kolejnych pracach doświadczalnych scharakteryzowaliśmy oddziaływania wybranych oczyszczonych białek ściany komórkowej *C. tropicalis* (adhezyna Hyr, enolaza i mutaza fosfoglicerynianowa) (II.3.11) oraz *C. parapsilosis* (dwa białka adhezyjne z rodziny białek Als,

białko szoku cieplnego Ssa2 oraz białko *moonlighting* – dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa Gnd1) (II.3.13) z ludzkim kininogenem wielkocząsteczkowym, a także plazminogenem w przypadku gatunku *C. parapsilosis*. Biorąc pod uwagę właściwości powierzchniowych białek grzybiczych i ich wieloaspektowe zaangażowanie w oddziaływania z gospodarzem, ta część badań dotyczyła również identyfikacji białek *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* oraz *C. glabrata* wiążących ludzkie białka macierzy zewnątrzkomórkowej – fibronektynę, witronektynę oraz lamininę (II.3.9, II.3.12). W tej grupie, oprócz typowych białek ściany komórkowej – klasycznych adhezyn z rodziny białek Als, Iff/Hyr i Epa, z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, sieciowania chemicznego i techniki LC-MS/MS, zidentyfikowane zostały również liczne nietypowe białka ściany komórkowej, w tym enolaza, izomeraza glukozy-6-fosforanowa, syntaza jabłczanu, dehydrogenaza 6-fosfoglukonianowa, fruktozo-1,6-bisfosfataza, transketolaza, transaldolaza i czynnik elongacji Eft2. Dalsze zaawansowane oraz strukturalne badania oddziaływania enolazy *C. albicans* i *C. tropicalis* z ludzkim plazminogenem, witronektyną oraz fibronektyną, realizowane przez nasz zespół badawczy, pozwoliły, między innymi, na wskazanie konkretnego fragmentu cząsteczki enolazy *C. albicans* obejmującego reszty aminokwasowe <sup>235</sup>DKAGYKGGKVGIAMDVASS EFYKDGK<sub>259</sub>, odpowiedzialnego za oddziaływania z trzema wymienionymi białkami ludzkimi (II.3.20). Ponadto wykazaliśmy w kolejnej publikacji doświadczalnej, że wiązanie pomiędzy białkami występującymi na powierzchni komórek *C. albicans*, w tym adhezyną Als3, ale także trzema *moonlighting proteins* – enolazą, izomerazą triozofosforanową i mutazą fosfoglicerynianową oraz białkowymi składnikami neutrofilowych sieci zewnątrzkomórkowych (NETs, ang. *neutrophil extracellular traps*), w tym elastazą, mieloperoksydazą oraz laktoferyną, znacznie zwiększało zdolności patogenu do inwazji na ludzkie komórki nabłonkowe, tym samym zwiększając jego wirulencję (II.3.21).

Rezultaty opisanych badań były uzyskane w wyniku realizacji projektów badawczych OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, w których byłam wykonawcą, a także projektów badawczych ze środków finansowych na naukę przyznanych Wydziałowi Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców, w których byłam kierownikiem oraz wykonawcą (zgodnie z punktem II.6 załącznika nr 4), oraz były przeze mnie prezentowane podczas konferencji krajowych oraz międzynarodowych w ramach prezentacji plakatowych oraz ustnych (zgodnie z punktem II.4 załącznika nr 4).

W przygotowanej przez nasz zespół kolejnej pracy przeglądowej II.3.26 podsumowaliśmy dostępne w literaturze naukowej informacje, dotyczące zaangażowania *moonlighting proteins* obecnych na powierzchni komórek grzybów z rodzaju *Candida* w oddziaływania z gospodarzem, wskazując na niezmiernie istotną rolę tych nietypowych białek ściany komórkowej w wiązaniu różnorodnych białek gospodarza, w interakcjach z komórkami nabłonka i śródbłonka, z komórkami układu odpornościowego, a także ich ważne znaczenie w odpowiedzi komórek grzybów na stres środowiskowy. Ponadto w publikacji przeglądowej II.3.29 porównaliśmy mechanizmy wirulencji dla trzech gatunków z rodzaju *Candida*, blisko spokrewnionych z gatunkiem *C. albicans*: *C. tropicalis*, *C. dubliniensis* oraz *C. auris*, biorąc pod uwagę różnice w czynnikach wirulencji tych grzybów, ich metabolizmie komórkowym, odpowiedzi na stres środowiskowy oraz uwzględniając charakter interakcji z komórkami gospodarza. Jednocześnie zwróciliśmy szczególną uwagę na problemy

w diagnostyce kandydoz, spowodowane licznymi podobieństwami pomiędzy tymi gatunkami grzybów, a także na bardzo aktualny i istotny problem związany z występowaniem wśród nich oporności na stosowane leki przeciwgrzybicze.

#### **4.3.4.2. Zaangażowanie wydzielniczych proteinaz aspartylowych *Candida* w interakcje z białkami gospodarza**

Drugi ważny aspekt badań nad czynnikami wirulencji grzybów z rodzaju *Candida*, które były prowadzone w naszym zespole badawczym i w których uczestniczyłam, dotyczył udziału wydzielniczych proteinaz aspartylowych (SAPs, ang. *secreted aspartyl proteinases*) różnych gatunków *Candida* w patogenezie zakażeń grzybiczych, w tym ich wpływie na układ produkcji kinin oraz produkcję sieci NETs przez neutrofile. W publikacji **II.3.3** wykazaliśmy, że SAPs produkowane przez wybrane gatunki *Candida*, w tym głównie *C. albicans* i *C. parapsilosis*, mogą brać udział w aktywacji układu produkcji kinin i uwalnianiu tych bioaktywnych peptydów na drodze hydrolizy kininogenu wielkocząsteczkowego i niskocząsteczkowego. Podczas dalszych szczegółowych badań wykorzystujących rekombinowane warianty proteinaz Sap1-10 *C. albicans* wykazaliśmy, że wspólne działanie proteinaz Sap9 oraz Sap1, Sap2, Sap4-6 i Sap8 na kininogen niskocząsteczkowy skutkowało hydrolizą tego białka i uwalnianiem biologicznie aktywnej Met-Lys-bradykininy (**II.3.8**). W badaniach dotyczących udziału różnych czynników wirulencji *C. albicans* w aktywacji neutrofile ludzkich do produkcji NETs wykazano, że komórki produkowały NETs najefektywniej w odpowiedzi na proteiny Sap4 i Sap6, w procesie obejmującym mieszane szlaki sygnałowe, zależne od reaktywnych form tlenu (ROS) i niezależne od ROS, głównie poprzez interakcje z receptorem CD11b. Natomiast w odpowiedzi na proteiny Sap9 i Sap10 związane ze ścianą komórkową, neutrofile wytwarzały NETs poprzez mechanizm zależny od ROS, wykorzystujący receptory CD16 i CD18 (**II.3.14**).

W przygotowanym przez nas rozdziale w monografii **II.1.5** oraz publikacji przeglądowej **II.3.25** podsumowaliśmy zarówno wyniki naszych badań, jak i wyniki badań innych zespołów badawczych, dotyczących charakterystyki i zaangażowania poszczególnych proteinaz aspartylowych gatunków *Candida* w aktywację lub dezaktywację białek gospodarza biorących udział w odpowiedzi immunologicznej lub będących składnikami ważnych proteolitycznych kaskad osoczowych odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy w organizmie gospodarza. Ponadto, w publikacji przeglądowej **II.3.31** podsumowaliśmy informacje dostępne w literaturze naukowej dotyczące nietypowych funkcji, jakie mogą być pełnione przez różne proteiny grzybicze, w tym SAPs *C. albicans*, niezależnie od ich aktywności proteolitycznej, co tym samym pozwoliło nam również na przyporządkowanie niektórych reprezentantów tej grupy grzybiczych enzymów hydrolitycznych do grupy białek *moonlighting*.

#### **4.3.4.3. Formowanie mieszanych biofilmów przez grzyby *C. albicans* oraz bakterie *Porphyromonas gingivalis***

W miejscu infekcji mikroorganizmy występują najczęściej w formie wielogatunkowych biofilmów, w obrębie których dochodzi do komunikacji i bezpośredniego kontaktu pomiędzy

komórkami patogenów. Jedną z nisz zasiedlanych przez grzyby *C. albicans* jest jama ustna, gdzie mogą one wchodzić w interakcje z bakteriami beztlenowymi w przebiegu zapalenia przyzębia i paradontozy. W ramach ważnego obszaru badawczego realizowanego przez nasz zespół w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky, przeprowadziliśmy szeroko zakrojone badania dotyczące wzajemnych oddziaływań pomiędzy *C. albicans* a bakteriami *Porphyromonas gingivalis*, które są uznawane za jeden z najważniejszych czynników ryzyka rozwoju paradontozy u ludzi, oraz dotyczące wpływu utworzenia mieszanego biofilmu na komórki gospodarza. Część prac dotyczących tej tematyki prowadzona była we współpracy z zespołem kierowanym przez prof. dr hab. Jana Potempę z Zakładu Mikrobiologii Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ oraz Department of Oral Immunology and Infectious Diseases, School of Dentistry, University of Louisville w USA.

Przeprowadzone w naszej grupie wstępne badania dotyczące czynników wirulencji *P. gingivalis* dotyczyły możliwości aktywacji osoczowego układu produkcji kinin na powierzchni komórek bakterii, w których to potwierdziliśmy wiązanie poszczególnych składników układu kontaktu, przede wszystkim HK oraz FXII, do obecnych na powierzchni bakterii proteinaz cysteinowych (gingipain) RgpA i Kgp, mających także właściwości adhezyn, co skutkowało aktywacją układu i uwalnianiem kinin. Uzyskane wyniki przedstawiono w publikacji **II.3.4**, która powstała także we współpracy z Prof. Heiko Herwaldem z Department of Clinical Sciences, Division of Infection Medicine, Biomedical Center, Lund University w Szwecji, Prof. Ky-Anh Nguyen z Faculty of Dentistry, University of Sydney w Australii oraz Prof. Sigrun Eick z Department of Periodontology, Laboratory of Oral Microbiology, School of Dentistry, University of Bern w Szwajcarii.

W rezultacie prowadzenia dalszych prac badawczych, dotyczących formowania wspólnego biofilmu przez *P. gingivalis* oraz *C. albicans* wykazaliśmy, że aktywność enzymu deiminazy peptydyloargininowej (PPAD), wydzielanego przez bakterie, ma istotne znaczenie w procesie formowania mieszanego biofilmu, kiedy to może dochodzić do modyfikacji (cytrulinacji) przez PPAD C-końcowych reszt argininy białek obecnych na powierzchni komórek *C. albicans*, w tym kilku *moonlighting proteins* – enolazy, kinazy fosfoglicerynianowej Pgg1, dehydrogenazy alkoholowej Adh1, heksokinazy Hxk2, dekarboksylazy pirogronianowej Pdc1 (**II.3.15**). Kolejne badania dotyczące udziału PPAD w formowaniu mieszanego biofilmu i analizie jego wpływu na białka gospodarza – HK i HPG, przedstawione w publikacji **II.3.19**, wskazywały, że cytrulinacja białek eksponowanych na powierzchni komórek grzybów zmniejszała poziom wiązania HPG, ale nie wpływała na wiązanie HK, kiedy białka ludzkie nie były poddane cytrulinacji przez PPAD, natomiast modyfikacja ludzkich białek przez PPAD nie zakłócała ich adsorpcji do niezmodyfikowanych przez PPAD komórek grzybów. Co istotne, cytrulinacja kinin przez PPAD wywierała istotny wpływ na oddziaływanie z receptorami komórkowymi kinin, zmniejszając ich powinowactwo, a tym samym wpływając na rolę tych peptydów w rozwoju stanu zapalnego. W badaniach przedstawionych w obu wymienionych publikacjach wykorzystyłam technikę LC-MS/MS w celu identyfikacji modyfikacji białek grzybiczych oraz białek ludzkich przez bakteryjny enzym PPAD w obecności gingipain, polegającej na przekształceniu C-końcowej reszty argininy w resztę cytruliny, co skutkowało wzrostem masy identyfikowanego peptydu o 1 Da. Podsumowując zatem, w obu pracach wykazaliśmy, że w trakcie tworzenia mieszanego biofilmu dochodzi do modulowania interakcji pomiędzy bakteriami, grzybami oraz białkami

ludzkimi poprzez aktywność białek enzymatycznych bakterii i funkcjonalność powierzchniowych białek grzybiczych eksponowanych na ścianie komórkowej.

W kolejnych badaniach analizowaliśmy wpływ tworzenia mieszanego biofilmu na przebieg infekcji bakteryjno-grzybiczej oraz wskazaliśmy mechanizm bezpośrednich interakcji pomiędzy komórkami grzybów i bakterii. W publikacji **II.3.16** wykazaliśmy, że w trakcie formowania biofilmu w warunkach tlenowych, które są niekorzystne dla *P. gingivalis*, formy strzępkowe *C. albicans* poprzez konsumpcję tlenu tworzą mikrośrodowisko chroniące te bakterie beztlenowe, co pozwala na dalszy rozwój mieszanego biofilmu, związany również z wpływaniem przez bakterie na poziom ekspresji grzybiczych genów m.in. kodujących główną adhezynę powierzchniową Als3, białko powierzchniowe Hwpl typowe dla strzępek oraz proteiny Sap6 i Sap9. Ponadto wskazaliśmy powierzchniowe białka odpowiedzialne za oddziaływanie pomiędzy bakteriami a grzybami, i były to odpowiednio gingipaina RgpA dla *P. gingivalis* oraz białka Als3, Mp65 i Eno1 dla *C. albicans*. Przeprowadzona przeze mnie analiza kinetycznych i fizykochemicznych parametrów wiązania z wykorzystaniem pomiarów SPR wykazała silne oddziaływanie opisywane równowagową stałą dysocjacji  $K_D$  w zakresie  $10^{-9}$  M dla każdej z badanych par oddziałujących białek. W publikacji **II.3.18** wykazaliśmy, że tworzenie wspólnego biofilmu przez *P. gingivalis* i *C. albicans* może zmieniać charakter zakażenia wywołanego przez oba te mikroorganizmy w kierunku infekcji przewlekłej, ponieważ konsekwencją formowania biofilmu mieszanego było osłabienie odpowiedzi makrofagów i fibroblastów i obniżenie produkcji cytokin i chemokin w porównaniu z infekcją wywołaną jedynie przez bakterie. Ponadto zaobserwowano, że fibroblasty wyizolowane od pacjentów z ciężkim zapaleniem przyzębia były mniej podatne na kolonizację grzybami, co wskazuje na modulowanie środowiska żywiciela przez dominującą infekcję bakteryjną, natomiast wyniki uzyskane dla mysiego modelu infekcji mieszanej, w którym to gatunek *C. albicans* inicjował infekcję, wykazały, że kolonizacja organizmu gospodarza powodowała łagodniejszy stan zapalny, prowadząc do znacznego zmniejszenia śmiertelności myszy, jednakże w dłuższym okresie czasu w obecności *C. albicans* w organizmach zwierzęcych odnotowano wysoką liczbę bakterii, co sugeruje przewlekły charakter zakażenia.

Rezultaty opisanych badań były uzyskane w wyniku realizacji projektów badawczych OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki, w których byłam wykonawcą (zgodnie z punktem **II.6** załącznika nr **4**), oraz były przeze mnie prezentowane podczas konferencji krajowych oraz międzynarodowych w ramach prezentacji plakatowych oraz ustnych (zgodnie z punktem **II.4** załącznika nr **4**).

Obserwacje uzyskane podczas badań prowadzonych w naszym zespole badawczym nad oddziaływaniem *C. albicans* z bakteriami rezydującymi w jamie ustnej oraz gatunkami zaangażowanymi bezpośrednio w rozwój paradontozy zostały przez nas podsumowane i opisane wraz z innymi dostępnymi danymi literaturowymi w dwóch rozdziałach w monografii (**II.1.6** i **II.1.7**) oraz w jednej publikacji przeglądowej (**II.3.28**).

#### **4.3.4.4. Wskazywanie nowych substancji o potencjalnym działaniu przeciwgrzybiczym**

Z racji coraz częściej występującej oporności na dotychczas stosowane leki przeciwgrzybicze, jaka jest raportowana dla *C. albicans* oraz dla innych chorobotwórczych

gatunków grzybów z tego rodzaju, konieczne jest poszukiwanie nowych i skutecznych rozwiązań terapeutycznych. W ramach badań zainicjowanych przez dr hab. Ibeth Guevarę-Lorę prowadzonych w Zakładzie Biochemii Analitycznej oraz Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky, w których uczestniczyłam, wykazaliśmy przeciwgrzybiczą aktywność dwóch syntetycznych peptydów –  $\Delta M3$  oraz  $\Delta M4$  – wywodzących się z owadziego peptydu przeciwdrobnoustrojowego – cekropiny D. Peptyd  $\Delta M4$  wykazywał działanie hamujące zmianę formy morfologicznej komórek *C. albicans* z pojedynczych komórek drożdżopodobnych w formę strzępkową oraz skutecznie hamował powstawanie biofilmu formowanego przez ten gatunek. Oba peptydy wykazywały również działanie przeciwgrzybicze względem pojedynczych komórek gatunków *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* i w wyższym stężeniu, także *C. glabrata*. Co więcej, żywotność komórek *C. albicans* tworzących dojrzały biofilm była hamowana przez peptyd  $\Delta M4$ , a temu zjawisku towarzyszyło zwiększone wytwarzanie ROS, aktywacja grzybiczych genów stresu oksydacyjnego *GPX3* i *SOD5*, oraz zwiększona przepuszczalność błony cytoplazmatycznej komórek grzybów. Ponadto oba peptydy wykazywały synergistyczne działanie z kaspofunginą w hamowaniu aktywności metabolicznej komórek *C. albicans*, a także efekt addytywny dla mieszanin peptydów z amfoterycyną B. Podsumowując, wyniki zaprezentowane w publikacji **II.3.23** wskazują na możliwy potencjał badanych peptydów  $\Delta M3$  oraz  $\Delta M4$  w profilaktyce i leczeniu kandydozy. W publikacji przeglądowej **II.3.27** podsumowaliśmy dostępne w literaturze naukowej informacje dotyczące różnych substancji pochodzenia roślinnego, które mogą wykazywać działanie przeciwgrzybicze względem różnych gatunków z rodzaju *Candida*.

## Bibliografia

- Albuquerque PC, Nakayasu ES, Rodrigues ML, i in. Vesicular transport in *Histoplasma capsulatum*: an effective mechanism for trans-cell wall transfer of proteins and lipids in ascomycetes. *Cell Microbiol.* 2008;10(8):1695-1710. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01160.x
- Almeida RS, Brunke S, Albrecht A, i in. the hyphal-associated adhesin and invasin Als3 of *Candida albicans* mediates iron acquisition from host ferritin. *PLoS Pathog.* 2008;4(11):e1000217. doi:10.1371/journal.ppat.1000217
- Arendrup MC. *Candida* and candidaemia. Susceptibility and epidemiology. *Dan Med J.* 2013;60(11):B4698.
- Bassetti M, Vena A, Meroi M, i in. Factors associated with the development of septic shock in patients with candidemia: a post hoc analysis from two prospective cohorts. *Crit Care.* 2020;24(1):117. doi:10.1186/s13054-020-2793-y
- Bielska E, May RC. Extracellular vesicles of human pathogenic fungi. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:90-99. doi:10.1016/j.mib.2019.05.007
- Bochenska O, Rapala-Kozik M, Wolak N, i in. Inactivation of human kininogen-derived antimicrobial peptides by secreted aspartic proteases produced by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Biol Chem.* 2015;396(12):1369-1375. doi:10.1515/hsz-2015-0167
- Bras G, Bochenska O, Rapala-Kozik M, i in. Release of biologically active kinin peptides, Met-Lys-bradykinin and Leu-Met-Lys-bradykinin from human kininogens by two major secreted aspartic proteases of *Candida parapsilosis*. *Peptides.* 2013;48:114-123. doi:10.1016/j.peptides.2013.08.003
- Brunke S, Hube B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata* infection strategies. *Cell Microbiol.* 2013;15(5):701-708. doi:10.1111/cmi.12091
- Chaffin WL. *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2008;72(3):495-544. doi:10.1128/MMBR.00032-07
- de Groot PW, de Boer AD, Cunningham J, i in. Proteomic analysis of *Candida albicans* cell walls reveals covalently bound carbohydrate-active enzymes and adhesins. *Eukaryot Cell.* 2004;3(4):955-965. doi:10.1128/EC.3.4.955-965.2004

- Decker BL, Wickner WT. Enolase activates homotypic vacuole fusion and protein transport to the vacuole in yeast. *J Biol Chem.* 2006;281(20):14523-14528. doi:10.1074/jbc.M600911200
- Delgado ML, Gil ML, Gozalbo D. *Candida albicans* TDH3 gene promotes secretion of internal invertase when expressed in *Saccharomyces cerevisiae* as a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-invertase fusion protein. *Yeast.* 2003;20(8):713-722. doi:10.1002/yea.993
- Desai JV. *Candida albicans* Hyphae: From Growth Initiation to Invasion. *J Fungi (Basel).* 2018;4(1):10. doi:10.3390/jof4010010
- Didiasova M, Schaefer L, Wygrecka M. When Place Matters: Shuttling of Enolase-1 Across Cellular Compartments. *Front. Cell Dev. Biol.* 2019;7:61. doi:10.3389/fcell.2019.00061
- Fan Y, He H, Dong Y, Pan H. Hyphae-specific genes *HGCI*, *ALS3*, *HWPI*, and *ECE1* and relevant signaling pathways in *Candida albicans*. *Mycopathologia.* 2013;176(5-6):329-335. doi:10.1007/s11046-013-9684-6
- Free SJ. Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet.* 2013;81:33-82. doi:10.1016/B978-0-12-407677-8.00002-6
- Gil-Bona A, Amador-García A, Gil C, Monteoliva L. The external face of *Candida albicans*: A proteomic view of the cell surface and the extracellular environment. *J Proteomics.* 2018;180:70-79. doi:10.1016/j.jprot.2017.12.002
- Gil-Bona A, Llama-Palacios A, Parra CM, i in. Proteomics unravels extracellular vesicles as carriers of classical cytoplasmic proteins in *Candida albicans*. *J Proteome Res.* 2015;14(1):142-153. doi:10.1021/pr5007944
- Gil-Navarro I, Gil ML, Casanova M, O'Connor JE, Martínez JP, Gozalbo D. The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J Bacteriol.* 1997;179(16):4992-4999. doi:10.1128/jb.179.16.4992-4999.1997
- Gozalbo D, Gil-Navarro I, Azorín I, Renau-Piqueras J, Martínez JP, Gil ML. The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect Immun.* 1998;66(5):2052-2059. doi:10.1128/IAI.66.5.2052-2059.1998
- Hernández ML, Ximénez-Embún P, Martínez-Gomariz M, Gutiérrez-Blázquez MD, Nombela C, Gil C. Identification of *Candida albicans* exposed surface proteins in vivo by a rapid proteomic approach. *J Proteomics.* 2010;73(7):1404-1409. doi:10.1016/j.jprot.2010.02.008
- Iida H, Yahara I. Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. 1985. *Nature (Lond.).* 315:688-690
- Jeffery CJ. Moonlighting proteins. *Trends Biochem Sci.* 1999;24(1):8-11. doi:10.1016/s0968-0004(98)01335-8
- Jeffery CJ. Moonlighting proteins: old proteins learning new tricks. *Trends Genet.* 2003;19(8):415-417. doi:10.1016/S0168-9525(03)00167-7
- Jong AY, Chen SHM, Stins MF, Kim KS, Tuan TL, Huang SH. Binding of *Candida albicans* enolase to plasmin(ogen) results in enhanced invasion of human brain microvascular endothelial cells. *J Med Microbiol.* 2003;52(Pt 8):615-622. doi:10.1099/jmm.0.05060-0
- Jung P, Mischo CE, Gunaratnam G, i in. *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence.* 2020;11(1):1453-1465. doi:10.1080/21505594.2020.1836902
- Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, i in. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol.* 2000;35(3):601-611. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01729.x
- Klis FM, de Koster CG, Brul S. A mass spectrometric view of the fungal wall proteome. *Future Microbiol.* 2011;6(8):941-951. doi:10.2217/fmb.11.72
- Latgé JP. Tasting the fungal cell wall. *Cell Microbiol.* 2010;12(7):863-872. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01474.x
- Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol.* 2007;66(2):279-290. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x
- Lee KL, Buckley HR, Campbell CC. An amino acid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of *Candida albicans*. *Sabouraudia.* 1975;13:148-53.



- Lee PY, Gam LH, Yong VC, Rosli R, Ng KP, Chong PP. Identification of immunogenic proteins of *Candida parapsilosis* by serological proteome analysis. *J Appl Microbiol* 2014a;116: 999–1009. doi:10.1111/jam.12408.
- Lee PY, Gam LH, Yong VC, Rosli R, Ng KP, Chong PP. Immunoproteomic analysis of antibody response to cell wall-associated proteins of *Candida tropicalis*. *J Appl Microbiol* 2014b;117: 854–865. doi:10.1111/jam.12562.
- Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J.* 2017;223(9):675–681. doi:10.1038/sj.bdj.2017.886
- Lipke PN, Klotz SA, Dufrene YF, Jackson DN, Garcia-Sherman MC. Amyloid-Like  $\beta$ -Aggregates as Force-Sensitive Switches in Fungal Biofilms and Infections. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017;82(1):e00035-17. Published 2017 Nov 29. doi:10.1128/MMBR.00035-17
- Logan C, Martin-Loeches I, Bicanic T. Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions. *Intensive Care Med.* 2020;46(11):2001–2014. doi:10.1007/s00134-020-06240-x
- Lu CF, Montijn RC, Brown JL, i in. Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha-agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol.* 1995;128(3):333–340. doi:10.1083/jcb.128.3.333
- McCarty TP, White CM, Pappas PG. Candidemia and Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2021;35(2):389–413. doi:10.1016/j.idc.2021.03.007
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400–428. doi:10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003
- Nickel W, Seedorf M. Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24:287–308. doi:10.1146/annurev.cellbio.24.110707.175320
- Nobbs AH, Vickerman MM, Jenkinson HF. Heterologous expression of *Candida albicans* cell wall-associated adhesins in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals differential specificities in adherence and biofilm formation and in binding oral *Streptococcus gordonii*. *Eukaryot Cell.* 2010;9(10):1622–1634. doi:10.1128/EC.00103-10
- Oh SH, Hoyer LL. Assessing Als3 Peptide-Binding Cavity and Amyloid-Forming Region Contributions to *Candida albicans* Invasion of Human Oropharyngeal Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:890839. Published 2022 Jul 13. doi:10.3389/fcimb.2022.890839
- Oh SH, Isenhower A, Rodriguez-Bobadilla R, i in. Pursuing Advances in DNA Sequencing Technology to Solve a Complex Genomic Jigsaw Puzzle: The Agglutinin-Like Sequence (ALS) Genes of *Candida tropicalis*. *Front Microbiol.* 2021b;11:594531. doi:10.3389/fmicb.2020.594531
- Oh SH, Schliep K, Isenhower A, i in. Using Genomics to Shape the Definition of the Agglutinin-Like Sequence (ALS) Family in the Saccharomycetales. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021a;11:794529. doi:10.3389/fcimb.2021.794529
- Oh SH, Smith B, Miller AN, i in. Agglutinin-Like Sequence (ALS) Genes in the *Candida parapsilosis* Species Complex: Blurring the Boundaries Between Gene Families That Encode Cell-Wall Proteins. *Front Microbiol.* 2019;10:781. doi:10.3389/fmicb.2019.00781
- Patricio P, Paiva JA, Borrego LM. Immune Response in Bacterial and *Candida* Sepsis. *Eur J Microbiol Immunol (Bp).* 2019;9(4):105–113. doi:10.1556/1886.2019.00011
- Pfaller MA, Carvalhaes CG, Smith CJ, Diekema DJ, Castanheira M. Bacterial and fungal pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2012–2017). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2020;97(2):115016. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2020.115016
- Pfaller MA, Diekema DJ, Turnidge JD, Castanheira M, Jones RN. Twenty Years of the SENTRY Antifungal Surveillance Program: Results for *Candida* Species From 1997–2016. *Open Forum Infect Dis.* 2019;6(Suppl 1):S79–S94. Published 2019 Mar 15. doi:10.1093/ofid/ofy358
- Polke M, Hube B, Jacobsen ID. *Candida* survival strategies. *Adv Appl Microbiol.* 2015;91:139–235. doi:10.1016/bs.aambs.2014.12.002
- Ramírez-Quijas MD, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Proteomic analysis of cell wall in four pathogenic species of *Candida* exposed to oxidative stress. *Microb Pathog.* 2015;87:1–12. doi:10.1016/j.micpath.2015.07.011

- Reyna-Beltrán E, Iranzo M, Calderón-González KG, Mondragón-Flores R, Labra-Barrios ML, Mormeneo S, Luna-Arias JP. The *Candida albicans* ENO1 gene encodes a transglutaminase involved in growth, cell division, morphogenesis, and osmotic protection. *J Biol Chem*. 2018;293:4304–23. doi:10.1074/jbc.M117.810440.
- Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 2006;6(1):14-29. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x
- Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Cuéllar-Cruz M. Moonlight-like proteins of the cell wall protect sessile cells of *Candida* from oxidative stress. *Microb Pathog*. 2016;90:22-33. doi:10.1016/j.micpath.2015.10.001
- Seweryn E, Pietkiewicz J, Szamborska A, Gamian A. Enolaza na powierzchni komórek eukariota i prokariota jako receptor plazminogenu ludzkiego [Enolase on the surface of prokaryotic and eukaryotic cells is a receptor for human plasminogen]. *Postępy Hig Med Dosw (Online)*. 2007;61:672-682.
- Sustr V, Foessleitner P, Kiss H, Farr A. Vulvovaginal Candidosis: Current Concepts, Challenges and Perspectives. *J Fungi (Basel)*. 2020;6(4):267. Published 2020 Nov 7. doi:10.3390/jof6040267
- Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011;10(9):1173-1182. doi:10.1128/EC.05085-11
- Urban C, Sohn K, Lottspeich F, Brunner H, Rupp S. Identification of cell surface determinants in *Candida albicans* reveals Tsa1p, a protein differentially localized in the cell. *FEBS Lett*. 2003;544(1-3):228-235. doi:10.1016/s0014-5793(03)00455-1
- Urban C, Xiong X, Sohn K, Schröppel K, Brunner H, Rupp S. The moonlighting protein Tsa1p is implicated in oxidative stress response and in cell wall biogenesis in *Candida albicans*. *Mol Microbiol*. 2005;57(5):1318-1341. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04771.x
- Vale-Silva LA, Sanglard D. Tipping the balance both ways: drug resistance and virulence in *Candida glabrata*, *FEMS Yeast Research* 2015;15(4), fov025, doi:10.1093/femsyr/fov025
- Vargas G, Rocha JD, Oliveira DL, i in. Compositional and immunobiological analyses of extracellular vesicles released by *Candida albicans*. *Cell Microbiol*. 2015;17(3):389-407. doi:10.1111/cmi.12374
- Vialás V, Perumal P, Gutierrez D, i in. Cell surface shaving of *Candida albicans* biofilms, hyphae, and yeast form cells. *Proteomics*. 2012;12(14):2331-2339. doi:10.1002/pmic.201100588
- Wistow GJ, Lietman T, Williams LA, i in. Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *J Cell Biol*. 1988;107(6 Pt 2):2729-2736. doi:10.1083/jcb.107.6.2729

## **5. INFORMACJA O WYKAZYWANIU SIĘ ISTOTNĄ AKTYWNOŚCIĄ NAUKOWĄ REALIZOWANĄ W WIĘCEJ NIŻ JEDNEJ UCZELNI LUB INSTYTUCJI NAUKOWEJ, W SZCZEGÓLNOŚCI ZAGRANICZNEJ.**

Prowadzone przeze mnie prace badawcze i pozostałe aktywności naukowe były realizowane we współpracy w następującymi ośrodkami krajowymi i zagranicznymi lub w ramach staży/szkoleń organizowanych przez następujące ośrodki zagraniczne:

- 5.1.** Pracownia Cytobiochemii, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii, Wydział Biologii, Uniwersytet w Białymstoku – współpraca naukowa z dr hab. Adamem Tylickim, prof. UwB oraz dr Urszulą Czyżewską w latach 2017-2019 polegała na porównywaniu profili białkowych grzybów *Malassezia pachydermatis*, będących oportunistycznymi patogenami dla zwierząt. W ramach współpracy wykorzystując technikę LC-MS/MS identyfikowałam specyficzne białka grzybicze, co pozwalało na wskazywanie różnic w proteomie szczepów *M. pachydermatis* wywołujących zakażenia u psów oraz szczepów komensalnych.

Efektom współpracy jest **publikacja**:

**II.3.17.** Czyżewska U., **Karkowska-Kuleta J.**, Bartoszewicz M., Siemieniuk M., Zambrzycka A., Tylicki A. 2019. Differences in protein profiles between *Malassezia pachydermatis* strains obtained from healthy and infected dogs. *Mycologia* 19:1-8. doi: 10.1080/00275514.2019.1630244.

IF<sub>2019</sub>: 2.149

punktacja MEiN [2019]: 100

liczba cytowań: 1

- 5.2.** Katedra Biochemii i Biofizyki, Instytut Biologii i Nauk o Ziemi, Uniwersytet Pedagogiczny im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie – współpraca naukowa z dr hab. Elżbietą Rudolphi-Szydło, prof. UP jest związana z realizacją Projektu badawczego przyznanego w ramach Priorytetowego Obszaru Badawczego BioS w programie strategicznym Inicjatywa Doskonałości w Uniwersytecie Jagiellońskim - **Minigranty we współpracy** B.1.7.2021, którego jestem kierownikiem. Czas realizacji tego projektu to okres od 20.10.2021 do 20.04.2023. Tematyka projektu dotyczy identyfikacji czynników wpływających na produkcję i wirulencję pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez patogenne grzyby z rodzaju *Candida*. Współpraca realizowana jest w zakresie wykorzystania modelu błony komórkowej komórek ludzkich z linii komórek promonocytarnych w celu przeprowadzenia analizy modyfikacji właściwości strukturalno-mechanicznych błon komórkowych w odpowiedzi na grzybicze EVs produkowane w warunkach stresu środowiskowego przez wybrane gatunki grzybów z rodzaju *Candida*. Dalsza współpraca jest również przewidziana w ramach realizowanego aktualnie projektu badawczego SONATA, którego jestem kierownikiem (czas realizacji projektu od 15.07.2022 do 14.07.2025), a zakres współpracy będzie obejmował przeprowadzenie analizy integralności i strukturalnej odpowiedzi błon komórkowych grzybów na składniki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych produkowanych przez bakterie probiotyczne.

- 5.3.** Bristol Dental School, University of Bristol, Bristol, Wielka Brytania – współpraca z Prof. Angelą H. Nobbs w zakresie wykorzystania w badaniach prowadzonych w naszym zespole badawczym przygotowanych i przekazanych szczepów *Saccharomyces cerevisiae* z nadekspresją typowych adhezyn ściany komórkowej *C. albicans*, w tym białek Als3, Hwp1 oraz Eap1.

Efektom współpracy są **publikacje**:

**I.5.** **Karkowska-Kuleta J.**, Wronowska E., Satała D., Zawrotniak M., Bras G., Kozik A., Nobbs A.H., Rapala-Kozik M. 2021. The Als3-mediated attachment of enolase on the surface of *Candida albicans* cells regulates their interactions with host proteins. *Cellular Microbiology*, e13297. <https://doi.org/10.1111/cmi.13297> (**A5**)

IF<sub>2021</sub>: 4.115

punktacja MEiN [2021]: 140

liczba cytowań: 9

**II.3.16.** Bartnicka D., **Karkowska-Kuleta J.**, Zawrotniak M., Satała D., Michalik K., Zielinska G., Bochenska O., Kozik A., Ciaston I., Koziol J., Dutton LC., Nobbs AH.,

Potempa B., Baster Z., Rajfur Z., Potempa J., Rapala-Kozik M. 2019. Adhesive protein-mediated cross-talk between *Candida albicans* and *Porphyromonas gingivalis* in dual species biofilm protects the anaerobic bacterium in unfavorable oxic environment. *Scientific Reports* 9(1):4376. doi: 10.1038/s41598-019-40771-8.

IF<sub>2019</sub>: 3.998

punktacja MEiN [2019]: 140

liczba cytowań: 25

**II.3.21. Karkowska-Kuleta J.**, Smolarz M., Seweryn-Ozog K., Satala D., Zawrotniak M., Wronowska E., Bochenska O., Kozik A., Nobbs A.H., Gogol M., Rapala-Kozik M. 2021. Proteinous Components of Neutrophil Extracellular Traps Are Arrested by the Cell Wall Proteins of *Candida albicans* during Fungal Infection, and Can Be Used in the Host Invasion. *Cells*, 10, 2736. doi:10.3390/cells10102736

IF<sub>2021</sub>: 7.666

punktacja MEiN [2021]: 140

liczba cytowań: 5

- 5.4.** Współpraca z Prof. Abhiramem Maddi (Division of Periodontics, Department of Stomatology, Medical University of South Carolina, James Edwards College of Dental Medicine, Charleston, SC, USA) w okresie lipiec 2021 – luty 2022, polegająca na współredagowaniu wydania specjalnego zatytułowanego „Fungal Cell Wall Proteins with Functions in Cell Wall Biogenesis, Cell Wall Signaling and Interactions with Host” wydanego w 2022 roku w czasopiśmie *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* ISSN 2235-2988, IF 6.073.

Efektom współpracy jest również **publikacja**:

**II.3.30. Karkowska-Kuleta J.** and Maddi A. 2022. Editorial: Fungal cell wall proteins with functions in cell wall biogenesis, cell wall signaling and interactions with host. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12:1064386. doi:10.3389/fcimb.2022.1064386

IF<sub>2020</sub>: 6.073

punktacja MEiN [2022]: 100

liczba cytowań: 0

- 5.5.** Współpraca z Prof. Sunilem Shaw (The Warren Alpert Medical School of Brown University Women i Infants' Hospital of Rhode Island, Rhode Island, USA) polegająca na współredagowaniu wydania specjalnego zatytułowanego „Multifunctional Fungal Proteins” w czasopiśmie *Journal of Fungi* ISSN 2309-608X, IF 5.724, w okresie czerwiec 2022 – czerwiec 2023.

- 5.6.** Szkolenie FEBS Advanced Course “Ligand-binding Theory and Practice 2016”, które odbyłam w okresie 03-10.07.2016, organizowane przez Academy and University Center Nove Hradu w Czechach, na którym zapoznałam się z metodami analizy oddziaływań białko-białko, a zdobyte umiejętności wykorzystałam podczas przygotowywania publikacji doświadczalnych **I.5 (A5)** oraz **II.3.16**. Podczas szkolenia przedstawiłam uzyskane wyniki w trakcie prezentacji ustnej **II.4.29**.

- 5.7.** Szkolenie EMBL Course “Extracellular Vesicles: From Biology to Biomedical Applications”, które odbyłam w okresie 27-31.03.2017, organizowane przez European

Molecular Biology Laboratory w Heidelbergu w Niemczech, na którym poznałam techniki izolacji oraz analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Dzięki zdobytym umiejętnościom mogłam przygotować wniosek o finansowanie pojedynczego działania badawczego w ramach konkursu MINIATURA Narodowego Centrum Nauki. Uzyskałam finansowanie projektu na okres 18.12.2019–18.12.2020 roku, a wyniki uzyskane podczas jego realizacji stanowiły wyniki wstępne, które wykorzystałam podczas przygotowywania wniosku o finansowanie projektu badawczego w ramach konkursu SONATA Narodowego Centrum Nauki. Uzyskałam finansowanie na realizację tego projektu od dnia 15.07.2022 roku, a jego czas realizacji przewidziany jest na 36 miesięcy. Część wyników uzyskanych w trakcie realizacji projektu została zamieszczona w manuskrypcie publikacji, który aktualnie znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Ponadto zajmuję się zagadnieniami związanymi z produkcją EVs przez *C. albicans* także w ramach realizacji projektu badawczego przyznanego w ramach Priorytetowego Obszaru Badawczego BioS w programie strategicznym Inicjatywa Doskonałości w Uniwersytecie Jagiellońskim - Minigranty we współpracy, w którym to nawiązałam i kontynuuję współpracę z dr hab. Elżbietą Rudolphi-Szydło z Instytutu Biologii Uniwersytetu Pedagogicznego im. Komisji Edukacji Narodowej w Krakowie. Realizacja projektu jest przewidziana do dnia 20.04.2023, a wyniki uzyskane podczas realizacji zadań badawczych są zawarte w manuskrypcie publikacji, który aktualnie przygotowuję do submisji.

Metodyka związana z izolacją i analizą pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jest aktualnie wykorzystywana w pracy badawczej naszego zespołu w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiky WBBiB, a jej bezpośrednim rezultatem są dwie publikacje doświadczalne:

**II.4. Karkowska-Kuleta J., Kulig K., Karnas E., Zuba-Surma E., Woznicka O., Pyza E., Kuleta P., Osyczka A., Rapala-Kozik M., Kozik A.** 2020. Characteristics of Extracellular Vesicles Released by the Pathogenic Yeast-Like Fungi *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*. *Cells* 9(7):E1722. <https://doi.org/10.3390/cells9071722>. (A4)

IF<sub>2020</sub>: 6.600

punktacja MEiN [2020]: 140

liczba cytowań: 21

**II.3.22. Kulig K., Karnas E., Woznicka O., Kuleta P., Zuba-Surma E., Pyza E., Osyczka A., Kozik A., Rapala-Kozik M., Karkowska-Kuleta J.** 2022. Insight Into the Properties and Immunoregulatory Effect of Extracellular Vesicles Produced by *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis* Biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 879237. doi:10.3389/fcimb.2022.879237

IF<sub>2022</sub>: 6.073

punktacja MEiN [2022]: 100

liczba cytowań: 3

- 5.8.** Szkolenie EMBL-EBI Course “Bioinformatic resources for protein biology”, które odbyłam w terminie 26-29.09.2017, organizowane przez European Molecular Biology Laboratory w Hinxton, w Wielkiej Brytanii, na którym zapoznałam się z narzędziami

bioinformatycznymi do analizy białek, a zdobyte umiejętności wykorzystałam podczas przygotowywania publikacji doświadczalnej **I.3 (A3)**.

**5.9.** Kurs 6th Central European Summer Course and 3rd Rising Stars in Mycology Workshop “Biology of Pathogenic Fungi”, w którym uczestniczyłam w dniach 5-11.07.2018, został zorganizowany przez Uniwersytet w Segedynie na Węgrzech. Podczas kursu zaprezentowałam uzyskane wyniki w trakcie prezentacji ustnej **II.4.24** oraz zapoznałam się z najbardziej aktualnymi kierunkami w badaniach nad biologią patogennych grzybów, co pozwoliło mi wyznaczyć obszary dalszej działalności badawczej.

**5.10.** Staż naukowy w ramach wyjazdów pracowników Uniwersytetu Jagiellońskiego w celach szkoleniowych w programie ERASMUS+ w akcji Mobilność z krajami programu, który odbyłam w okresie 3-7.10.2022 na Wydziale Nauk o Zdrowiu, na Uniwersytecie w Mediolanie we Włoszech, gdzie pod kierunkiem Prof. Elisy Borghi oraz Dr. Emerenziany Ottaviano odbyłam szkolenie dotyczące pracy z alternatywnym modelem zwierzęcym *Galleria mellonella*. Badania z wykorzystaniem larw *G. mellonella* zostały zaplanowane w realizowanym aktualnie projekcie badawczym SONATA, którego jestem kierownikiem, w celu sprawdzenia odpowiedzi odpornościowej alternatywnego organizmu modelowego na podanie pęcherzyków zewnątrzkomórkowych produkowanych przez *Candida non-albicans* oraz badanie wirulencji komórek *Candida* traktowanych grzybiczymi lub bakteryjnymi pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi. Część wyników uzyskana podczas pracy z *G. mellonella* została zamieszczona w manuskrypcie publikacji, który aktualnie znajduje się w recenzji w czasopiśmie *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.

**5.11.** Staż naukowy w programie wymiany osobowej naukowców w ramach współpracy bilateralnej organizowanej przez Narodową Agencję Wymiany Akademickiej (NAWA), który odbyłam w okresie 14.01.2023 - 12.02.2023 na Uniwersytecie Karola w Pradze, w Czechach, gdzie pod kierunkiem Prof. Olgi Heidingsfeld w Zakładzie Biochemii Wydziału Nauk Przyrodniczych odbyłam szkolenie dotyczące izolacji frakcji homogenatu komórkowego *Candida*. Nabyte umiejętności oraz rozpoczęta współpraca naukowa pozwolą mi kontynuować badania dotyczące mechanizmów transportu białek *moonlighting* oraz biogenezy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

## **6. INFORMACJA O OSIĄGNIĘCIACH DYDAKTYCZNYCH, ORGANIZACYJNYCH ORAZ POPULARYZUJĄCYCH NAUKĘ**

### **6.1. Osiągnięcia dydaktyczne**

W latach 2017-2022 byłam promotorem trzech prac magisterskich i opiekunem czterech prac licencjackich studentów kierunku Biochemia oraz Biotechnologia i Biotechnologia molekularna (lista prac zamieszczona jest w punkcie **V.2** w załączniku **4**), w toku jest przygotowanie czterech kolejnych prac magisterskich. Wszystkie te prace są pracami doświadczalnymi. Ponadto w latach 2015-2022 byłam recenzentem 12 prac licencjackich oraz pięciu prac magisterskich, oraz członkiem czterech komisji podczas egzaminów magisterskich.

Jestem również aktualnie promotorem pomocniczym podczas przygotowywania rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Surowiec, planowany tytuł rozprawy doktorskiej to „Analiza zmian w biofilmie mieszanym bakteryjno-grzybiczym w kontakcie z komórkami gospodarza”, natomiast planowany termin obrony to 2024 rok.

Dodatkowo uczestniczyłam w licznych szkoleniach i kursach organizowanych przez Uniwersytet Jagielloński, aby poszerzać swoje kompetencje dydaktyczne. Były to między innymi warsztaty dydaktyczne Ars Docendi, warsztaty w ramach Tygodnia Jakości Kształcenia, szkolenia organizowane przez Centrum Zdalnego Nauczania oraz kursy STEM-CPD@EUni Project microMOOC – wszystkie kursy zostały wymienione w punkcie **III.8** w załączniku **4**. Od roku 2010 prowadziłam kilkanaście różnych kursów (ćwiczenia, seminaria, konwersatoria) dla studentów kierunku Biotechnologia, Biochemia, Biofizyka na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii (wymienione w punkcie **V.1** w załączniku **4**), a oceny uzyskiwane przez mnie w ankietach studenckich przeprowadzanych w celu oceny działalności dydaktycznej uzyskane w latach 2011, 2013-2018, 2020, 2021 były bardzo wysokie (w roku 2012 oraz 2019 przebywałam na urlopie macierzyńskim) i lokowały się w średniej oraz powyżej średniej oceny uniwersyteckiej. Ponadto brałam udział w przygotowaniu materiałów dydaktycznych do nowych kursów przeznaczonych dla studentów kierunku Biochemia, w tym kursu „Biochemia analityczna” oraz „Wprowadzenie do biochemii leków”. Podczas pracy dydaktycznej wykorzystywałam również wiedzę i umiejętności, jakie zdobyłam podczas zagranicznych pobytów naukowych i szkoleń, przede wszystkim dotyczących narzędzi bioinformatycznych wykorzystywanych do analizy białek, z którymi zapoznałam się podczas szkolenia “Bioinformatic resources for protein biology” w Wielkiej Brytanii oraz dotyczących metod analizy oddziaływań białko-białko, z którymi zapoznałam się podczas kursu „Ligand-binding Theory and Practice 2016” w Czechach.

Byłam także opiekunem naukowym studenckiego projektu badawczego finansowanego z dotacji projakościowej Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla kierunku biochemia Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Tytuł projektu to „Wpływ kinin produkowanych z ludzkich kininogenów przez sekrecyjne proteiny *Candida albicans* na przepuszczalność śródbłonna”. Projekt był realizowany pod moją opieką przez trzy studentki kierunków Biotechnologia lub Biochemia, zakończył się w roku 2014, a jego efektem było przygotowanie publikacji w języku polskim: **II.3.32**. Karkowska-Kuleta J., Ostrowska D., Zajac D. 2014. Rola kinin produkowanych przez sekrecyjne proteiny *Candida* spp. w rozwoju reakcji zapalnej. *Dokonania Młodych Naukowców*, str. 36-41, pod redakcją Marcina Kuczery, CreativeTime, Kraków. ISSN 2300-4436.

Moja działalność dydaktyczna była również związana z udziałem w projekcie „Metabolizm komórki a czynniki toksyczne” realizowanym w ramach akcji Uniwersytet Młodych Wynalazców zorganizowanej we współpracy z MNiSW oraz MEN w roku 2015. W trakcie projektu naukowego realizowanego przez Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego oraz V LO im. A. Witkowskiego w Krakowie współorganizowałam praktyczne warsztaty laboratoryjne dla uczniów liceum ogólnokształcącego obejmujące serię doświadczeń poświęconych własnościom dwóch witamin rozpuszczalnych w wodzie: witaminie C oraz witaminie B<sub>2</sub> (ryboflawinie), pełniłam funkcję współopiekuna studentów realizujących projekt naukowy w ramach programu oraz przedstawiałam wykład pt. „Sprzymierzeńcy i wrogowie w walce ze stresem oksydacyjnym w ludzkich komórkach neuronalnych” podczas konferencji podsumowującej program w dniu 4.11.2015. Ponadto prowadziłam wykład pt. „Grzyby chorobotwórcze dla człowieka – w jaki sposób drożdże (i nie tylko...) wywołują zakażenia u ludzi?” dla młodzieży licealnej z Krakowskiego

Młodzieżowego Towarzystwa Przyjaciół Nauk i Sztuki w Centrum Młodzieży im. dr. H. Jordana w dniu 31.03.2015.

## 6.2. Osiągnięcia organizacyjne i popularyzujące naukę

Moja działalność organizacyjna na Uniwersytecie Jagiellońskim związana jest z reprezentowaniem nauczycieli akademickich bez stopnia doktora habilitowanego w Radzie Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie w okresie od 23.05.2017 do 12.10.2020 oraz z członkostwem w Komisji ds. bezpieczeństwa biologicznego w Zakładzie Inżynierii Genetycznej 11 na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego od 2016 roku.

Ponadto pełniłam funkcję członka Komitetu Organizacyjnego konferencji XLIV Winter School of the Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology of the Jagiellonian University in Kraków *No stress – no life*, odbywającej się w terminie 14-18.02.2017 w Zakopanem oraz prowadziłam sesję wykładową (Chair): Training Session: *Proteomics, Principles, Techniques and Applications* podczas konferencji XLIX Winter School of the Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology of the Jagiellonian University in Kraków *Omics research – from methodology to application*, odbywającej się w terminie 22-24.02.2022 w Krakowie.

Aktywnie angażuję się również w działalność redakcyjną w kilku międzynarodowych czasopismach naukowych z listy *Journal Citation Reports*, w których pełniłam lub nadal pełnię, rolę redaktora wydania specjalnego, członka rady recenzentów oraz tematycznej rady redakcyjnej (pełny wykaz w załączniku 4, punkt II.9). Przygotowałam recenzje 46 publikacji dla czasopism, w tym dla prestiżowego czasopisma *Journal of Extracellular Vesicles* (aktualny impact factor 17.337) (pełny wykaz w załączniku 4, punkt II.10).

Moje osiągnięcia związane z popularyzacją nauki są związane z opublikowaniem kilkunastu prac przeglądowych w języku polskim – były to cztery rozdziały w monografiach (punkt II.1.1-II.1.4 w załączniku 4) oraz 11 artykułów przeglądowych (punkt II.3.32-II.3.43 w załączniku 4), w których opisywałam różne aspekty mechanizmów patogenezы zakażeń grzybiczych oraz bakteryjnych, również dotyczących funkcji *moonlighting proteins* czy produkcji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. Wielokrotnie brałam również udział w konferencjach dla młodych naukowców jako członek Komitetu Organizacyjnego oraz Komitetu Naukowego konferencji, kiedy to naukowo wspierałam uczestników konferencji, prowadziłam sesje wykładowe czy oceniałam prezentacje plakatowe. Były to różne edycje następujących konferencji: Wpływ młodych naukowców na osiągnięcia polskiej nauki, Dokonania Naukowe Doktorantów, Nowe wyzwania dla polskiej nauki. Spojrzenie młodych naukowców, Zagrożenia dla środowiska. Spojrzenie Młodych Naukowców, Nauki biologiczne i chemiczne. Spojrzenie Młodych Naukowców, Biologia, Chemia i Środowisko - Spojrzenie Młodych Naukowców, Analiza zagadnienia, analiza wyników – wystąpienie młodego naukowca, Nowe trendy w badaniach naukowych – wystąpienie młodego naukowca, COVID-19. Spojrzenie młodych naukowców, Inżynieria. Spojrzenie młodych naukowców – łącznie 33 edycje konferencji.



## 7. POZOSTAŁE INFORMACJE DOTYCZĄCE KARIERY ZAWODOWEJ

Rezultaty badań uzyskane podczas realizacji zadań wchodzących w skład cyklu publikacji oraz publikacji spoza cyklu były przedstawiane przeze mnie podczas krajowych i międzynarodowych konferencji naukowych w ramach prezentacji plakatowych oraz ustnych (załącznik 4, punkt II.4). Łącznie przedstawiłam 13 prezentacji ustnych na krajowych konferencjach polskojęzycznych i anglojęzycznych oraz pięć prezentacji ustnych podczas konferencji międzynarodowych, a także 12 prezentacji plakatowych podczas konferencji międzynarodowych i zaprezentowałam jeden plakat podczas konferencji krajowej. Wyniki i wnioski przedstawione w cyklu publikacji wchodzących w skład osiągnięcia zostały przeze mnie podsumowane podczas wykładu inauguracyjnego pod tytułem *Wielofunkcyjność białek enzymatycznych* wygłoszonego przeze mnie na zaproszenie organizatorów podczas V Konferencji Naukowej ENZYMOŚ Enzymy w nauce i przemyśle organizowanej w dniu 5.02.2021 przez Fundację na rzecz promocji nauki i rozwoju TYGIEL, oraz wykładu na zaproszenie wygłoszonego w trakcie seminarium organizowanego przez Zakład Biochemii na Wydziale Nauk Przyrodniczych, na Uniwersytecie Karola w Pradze (Katedra biochemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Karlovy) pod tytułem *Moonlighting proteins at the cell surface of Candida pathogenic fungi – their transport to the cell surface and interactions with human proteins* wygłoszonego w dniu 30.01.2023.

W trakcie realizacji badań prowadzonych w Zakładzie Biochemii Porównawczej i Bioanalitiki oraz Zakładzie Biochemii Analitycznej byłam wykonawcą w czterech projektach OPUS finansowanych przez Narodowe Centrum Nauki kierowanych przez prof. dr hab. Marię Rapałę-Kozik oraz prof. dr hab. Andrzeja Kozika. Ponadto aktywnie zdobywałam fundusze na finansowanie badań oraz realizowałam projekty badawcze, w których byłam kierownikiem i wykonawcą jeszcze przed uzyskaniem stopnia doktora – był to projekt "Doctus – Małopolski fundusz stypendialny dla doktorantów" oraz projekt badawczy ze środków finansowych na naukę przyznanych Wydziałowi Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (instytucja realizująca: MNISW) w latach 2009-2012. Także po uzyskaniu stopnia doktora realizowałam łącznie cztery projekty badawcze uzyskane ze środków finansowych na naukę przyznanych Wydziałowi Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego na działalność służącą rozwojowi młodych naukowców, ponadto realizowałam roczny projekt badawczy Narodowego Centrum Nauki MINIATURA przeznaczony na realizację pojedynczego działania badawczego, a obecnie jestem kierownikiem projektu badawczego przyznanego w ramach Priorytetowego Obszaru Badawczego BioS w programie strategicznym Inicjatywa Doskonałości w Uniwersytecie Jagiellońskim - Minigranty we współpracy B.1.7.2021 oraz projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki SONATA (załącznik 4, punkt II.6).

W ramach uznania szczególnych osiągnięć w pracy na rzecz Uniwersytetu Jagiellońskiego pięciokrotnie otrzymałam wraz z innymi członkami naszego zespołu Nagrodę Rektora zespołową III stopnia za osiągnięcia naukowe.

.....  
(podpis wnioskodawcy)